

**Der TOM-Core-Komplex und die
kanalbildende Komponente Tom40
der Proteintranslokase der äußeren
Mitochondrienmembran
von *Neurospora crassa***

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Uwe Ahting
2002

Dissertation eingereicht am 7.12.2001

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Zweitgutachter: PD Dr. L. Eichacker

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Mündliche Prüfung am 15.4.2002

*„Ach Gott! die Kunst ist lang;
Und kurz ist unser Leben.
Mir wird, bei meinem kritischen Bestreben,
Doch oft um Kopf und Busen bang.
Wie schwer sind nicht die Mittel zu erwerben,
Durch die man zu den Quellen steigt!
Und eh man nur den halben Weg erreicht,
Muß wohl ein armer Teufel sterben.*

...

*..... es ist ein groß Ergetzen,
Sich in den Geist der Zeiten zu versetzen;
Zu schauen, wie vor uns ein weiser Mann gedacht,
Und wie wir's dann zuletzt so herrlich weit gebracht.“*

Goethe, Faust I, 558-573

Inhalt

1	Einleitung.....	3
1.1	Proteinimport in Mitochondrien	3
1.2	Eigenschaften von mitochondrialen Vorstufenproteinen	5
1.3	Vorstufenproteine im Cytosol	6
1.4	Translokation der Vorstufenproteine über die mitochondriale Außenmembran	7
1.4.1	Die Komponenten des TOM-Komplexes	8
1.4.2	Funktion der einzelnen Tom-Komponenten	11
1.4.3	Der isolierte TOM-Komplex aus <i>Neurospora crassa</i>	13
1.5	Translokation von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Innenmembran und die Matrix	15
1.6	Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	17
2	Materialien und Methoden	19
2.1	Molekularbiologische Methoden	19
2.1.1	Verwendete Plasmide	19
2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	19
2.1.2.1	Mini-Präparation	20
2.1.2.2	Maxi-Präparation	20
2.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	21
2.1.4	Phenolextraktion und Ethanol-fällung	21
2.1.5	Restriktionsverdau von DNA	22
2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	22
2.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.1.8	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.1.9	Elution von DNA aus Agarosegelen	23
2.1.10	Transformation von <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA	24
2.1.11	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit rekombinanter DNA	25
2.1.12	Herstellung von Hefe- und <i>Neurospora crassa</i> -Stämmen mit einem Tom40 mit C-terminalem Hexahistidinyrest	25
2.1.12.1	Herstellung der Plasmide	25
2.1.12.2	Herstellung der Hefe-Stämme mit einem Tom40 mit aminoterminaler 6xHis-Erweiterung	27
2.1.12.3	Herstellung von <i>Neurospora crassa</i> -Stämmen mit einem Tom40 mit N-terminalem Hexahistidinyrest	28
2.2	Zellbiologische Methoden	32
2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
2.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.2.3	Kultivierung von <i>Neurospora crassa</i>	33
2.2.3.1	Kultivierung in Minimalmedium	33
2.2.3.2	Kultivierung in Minimalmedium mit ³⁵ S-Sulfat	34
2.2.4	Isolierung von Mitochondrien aus <i>N. crassa</i>	35
2.2.5	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.2.6	Isolierung der mitochondrialen Außenmembran von <i>Neurospora crassa</i>	37
2.3	Proteinbiochemische Methoden	38
2.3.1	Isolierung des TOM-Holo-Komplexes aus Außenmembranvesikeln	38
2.3.2	Herstellung von TOM-Core-Komplex aus gereinigtem TOM-Gesamkomplex	39
2.3.3	Isolierung des TOM-Core-Komplexes aus Mitochondrien	39
2.3.4	Isolierung von Tom40 aus Außenmembranvesikeln	40
2.3.5	Isolierung von TOM-Core-Komplex und von Tom40 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2.3.5.1	Alkalische Lyse von Hefezellen	41
2.3.5.2	Isolierung von TOM-Core-Komplex aus Hefemitochondrien	41

2.3.5.3	Isolierung von Tom40 aus Hefemitochondrien	42
2.3.6	Zerlegung des TOM-Core-Komplexes und Reinigung von Tom40 von <i>Neurospora crassa</i>	42
2.3.7	Isolierung von Porin aus Außenmembranvesikeln	43
2.3.8	Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine	44
2.3.9	Trypsinisierung des TOM-Core-Komplexes	45
2.3.10	Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	46
2.3.10.1	<i>In vitro</i> Transkription	46
2.3.10.2	<i>In vitro</i> Translation	46
2.3.11	Import <i>in vitro</i> synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien	47
2.3.12	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> -Einschlußkörperchen	47
2.3.13	Bindungsstudien von mitochondrialen Präproteinen an Außenmembranvesikel und isolierten TOM-Komplex	48
2.4	Proteinanalytische Methoden	49
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.4.1.1	Bestimmung nach Bradford	49
2.4.1.2	Bestimmung nach der Biuret-Methode	49
2.4.1.3	Bestimmung mittels Absorption im Ultraviolett-Bereich	50
2.4.2	Fällung von Proteinen	50
2.4.2.1	Fällung mit Trichloressigsäure	50
2.4.2.2	Fällung mit Aceton	51
2.4.3	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	51
2.4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	52
2.4.4.1	Standard-SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.4.4.2	High-Tris-Harnstoff-Gelelektrophorese	52
2.4.4.3	Blaue Nativgelelektrophorese	53
2.4.4.4	Alkalische Nativgelelektrophorese	53
2.4.5	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen ("Western Blotting")	54
2.4.5.1	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	54
2.4.5.2	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	54
2.4.6	Autoradiographie, Fluorographie und Densitometrie von Polyacrylamidgelen	55
2.4.7	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrocellulosemembranen	55
2.4.8	Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	56
2.4.8.1	Silberfärbung	56
2.4.8.2	Färbung mit Coomassie-Blau	57
2.4.9	Gelfiltration	57
2.5	Spektroskopische Methoden	58
2.5.1	Circular-Dichroismus	58
2.5.2	Messung von Infrarot-Spektren	58
2.5.3	Analytische Ultrazentrifugation	59
2.6	Elektrophysiologische Methoden	61
2.6.1	Apparativer Aufbau	61
2.6.2	Erzeugung von künstlichen Lipid-Doppelschichten	61
2.6.3	Messung der Ionenleitfähigkeit von TOM-Komplex-Kanälen	62
2.6.4	Messung der Ionenselektivität von TOM-Komplex-Kanälen	62
2.7	Elektronenmikroskopische Methoden	63
2.7.1	Apparativer Aufbau	63
2.7.2	Erzeugung amorpher Kohlefilme auf Kupfernetzchen	63
2.7.3	Erhöhung der Proteinadsorption durch Glühentladung	63
2.7.4	Negativ-Kontrastierung der Proben mit Uranylacetat	64
2.7.5	Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen durch rechnergestützte Bildanalyse	64
2.8	Regenerierung von Ni-NTA-Säulenmaterial	65
2.9	Geräte, Chemikalien und Enzyme	65
2.9.1	Geräte	65
2.9.2	Chemikalien und Enzyme	66

3	Ergebnisse.....	68
3.1	Isolierung und biochemische Charakterisierung des TOM-Core-Komplexes von <i>Neurospora crassa</i> ..	68
3.1.1	Zerlegung des TOM-Holo-Komplexes.....	68
3.1.2	Isolierung und Aufreinigung des TOM-Core-Komplexes.....	71
3.1.3	Tom5 in <i>Neurospora crassa</i>	77
3.1.4	Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes	79
3.1.5	Die Stöchiometrie der Komponenten des TOM-Core-Komplexes	82
3.1.6	Tom40 ist in oligomerer Form an der Struktur des TOM-Komplexes beteiligt.....	83
3.1.7	Isolierung eines TOM-Core-Komplexes ohne die hydrophilen Domänen von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5.....	84
3.2	Isolierung und Charakterisierung von Tom40	85
3.2.1	Zerlegung des TOM-Core-Komplexes	85
3.2.2	Tom40 bildet oligomere Komplexe.....	87
3.2.3	Isolierung von Hexahistidyl-Tom40 aus <i>Neurospora crassa</i>	90
3.3	Funktionelle Charakterisierung der verschiedenen Formen des TOM-Komplexes	91
3.3.1	Bindung mitochondrialer Vorstufenproteine an isolierten TOM-Core-Komplex	91
3.3.2	Elektrophysiologische Untersuchungen zum TOM-Core-Komplex, trypsinisierten TOM-Core-Komplex und Tom40	96
3.3.2.1	Kanaleigenschaften von TOM-Core-Komplex, trypsinisierter TOM-Core-Komplex und Tom40	97
3.3.2.2	Die Kanalaktivität von trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex läßt sich durch Präpeptid hemmen	100
3.3.2.3	Tom40 bildet nicht-klassische Kanäle.....	102
3.4	Strukturelle Untersuchungen zum TOM-Core-Komplex und zu Tom40.....	103
3.4.1	CD-Spektroskopie an TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und mitochondrialem Porin.....	103
3.4.2	FTIR-Spektroskopie von TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und mitochondrialem Porin	105
3.4.3	Elektronenmikroskopische Struktur des TOM-Core- und des Tom40-Komplexes	108
3.4.4	Dreidimensionale Rekonstruktion des TOM-Core-Komplexes	111
4	Diskussion	113
4.1	Der Zusammensetzung des TOM-Komplexes.....	114
4.1.1	Tom5 in <i>Neurospora crassa</i>	114
4.1.2	Die Molekülmasse der verschieden Arten des TOM-Komplexes	115
4.1.3	Die Stöchiometrie des TOM-Core-Komplexes	117
4.2	Die Kanaleigenschaften des TOM-Komplexes	119
4.3	Die Bindung von Vorstufenproteinen an den TOM-Komplex und seine Komponenten	122
4.4	Die Struktur des TOM-Komplexes.....	125
4.4.1	Die Rolle der Rezeptoren Tom70 und Tom20 in der Struktur des TOM-Komplexes	125
4.4.2	Die Sekundärstruktur des Tom40	126
4.4.3	Die Rolle von Tom40 an der Struktur des TOM-Komplexes.....	127
4.4.4	Die Bildung der „Generellen Import-Pore“ (GIP).....	128
5	Zusammenfassung	131
6	Anhang: Die bekannten Tom-Komponenten.....	133
7	Zitierte Literatur	135
8	Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen.....	148

Abkürzungsverzeichnis

AAC	ADP/ATP-Carrier
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMV	Außenmembranvesikel
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
β -ME	β -Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin
CCHL	Cytochrom c-Häm-Lyase
Cyt b2	Cytochrom b2
Cyt c	Cytochrom c
Cyt c1	Cytochrom c1
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DHFR	Dihydrofolatreductase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
$\Delta\Psi$	Elektrisches Membranpotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F1 β	β -Untereinheit der mitochondrialen F1-ATPase
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Leitfähigkeit (Kehrwert des elektrischen Widerstandes)
GIP	Generelle Import-Pore
his6	Hexahistidyl-Erweiterung an einer Polypeptidkette
hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IM	Innenmembran
IMS	Intermembranraum
IP	Immunopräzipitation
kDa	kilo-Dalton
KP _i	Kaliumphosphat
LB	Nährmedium nach Luria und Bertani
MOPS	N-Morpholinoethansulfonsäure
MPP	Matrixprozessierungspeptidase
MSA	Statistische Analyse der Variabilität (aus dem Englischen: multivariate statistical analysis)
MSF	mitochondrial import stimulation factor
MTX	Methotrexat
Mut	mutiert
MW	Molekulargewicht
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NADP	Nicotinsäureamid-adeninnukleotid-phosphat
n.d.	nicht bestimmt
OD	Optische Dichte

OG	n-Octyl- β -D-Glucopyranosid
OM	Außenmembran
P	Permeabilität (z.B. P_c , Permeabilität für Kationen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	Präimmunserum
pI	Isoelektrischer Punkt
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	Peptid-sensitiver Kanal
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Rinonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
Upm	Umdrehungen pro Minute
RCMLA	reduziertes, carboxymethyliertes Laktabumin
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Saccharose-EDTA-MOPS-Puffer
STI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
Su9	Untereinheit 9 der mitochondrialen F_0F_1 -ATPase
Su9(1-69)-DHFR	Fusionsprotein aus den ersten 69 Aminosäureresten von Su9 und DHFR
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tim	Komponente der Innenmembranproteintranslokase
Tom	Komponente der Außenmembranproteintranslokase
TOM	Translokase der mitochondrialen Außenmembran
TOM-CK	TOM-Core-Komplex
TOM-HK	TOM-Holo-Komplex
TOC	Translokase der Chloroplasten-Außenmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
TX-100	Triton X-100
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 *Proteinimport in Mitochondrien*

Die Biogenese der Mitochondrien schließt den Import von Proteinen mit ein. Obwohl die Mitochondrien über ein eigenes Genom und eine eigene Expressionsmaschinerie verfügen, sind nur wenige Proteine in den Mitochondrien selbst kodiert und werden dort synthetisiert (Lithgow, 2000). Die Mehrzahl ist im Genom des Kerns kodiert. Da die Translation dieser Proteine im Cytosol stattfindet, müssen sie in die Mitochondrien importiert werden. Es muß nicht nur sichergestellt werden, daß die im Cytosol synthetisierten Proteine auf die richtigen Organellen verteilt werden, sondern ebenso, daß sie den richtigen Ort ihrer Funktion im Organell erreichen.

Grundsätzlich kann man im Mitochondrium vier verschiedene Kompartimente unterscheiden:

- die Außenmembran;
- die Innenmembran, die stark gefaltet ist und somit eine weit größere Aufnahmekapazität für Proteine hat als die Außenmembran;
- den Intermembranraum zwischen Außen- und Innenmembran; und
- die mitochondriale Matrix, den Teil des Mitochondriums, der von der Innenmembran umschlossen ist.

Während die Außenmembran für Moleküle kleiner als 3 kDa frei durchlässig ist, da das Porin offene Kanäle in der Membran bildet, ist das bei der Innenmembran nicht der Fall (Benz, 1994).

Die in die Mitochondrien zu importierenden Proteine werden als Vorstufenproteine synthetisiert, die die Information zum Erreichen ihres Zielortes enthalten. Diese Information hat zumeist die Form einer aminoterminalen Signalsequenz, die nach erfolgter Sortierung abgespalten wird. Die Information kann aber auch als nichtabzuspaltende Sequenz am Ende oder innerhalb der Polypeptidkette lokalisiert sein. Spätestens am Zielort erlangen die Vorstufenproteine ihre endgültige Konformation und aus Vorstufenproteinen werden residente Proteine (Neupert, 1997).

Am Eintransport und der Sortierung der Vorstufenproteine sind zahlreiche Proteine in den Mitochondrien beteiligt (Abb.1).

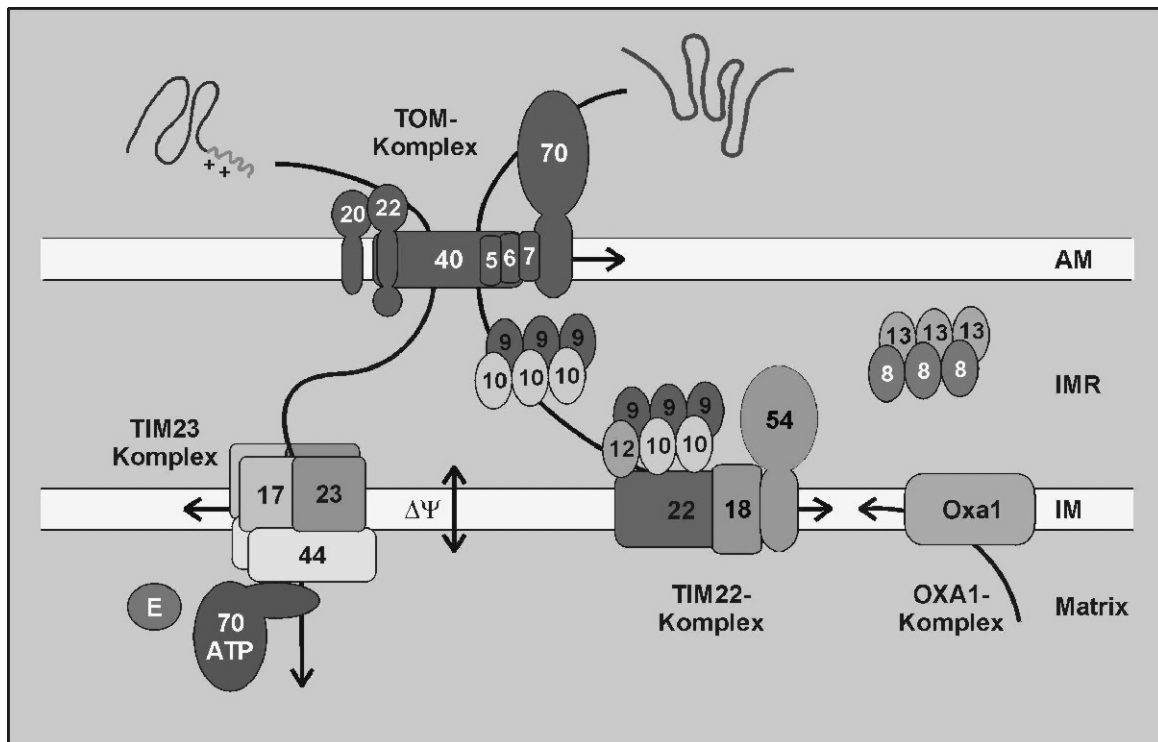


Abbildung 1: Proteinimport in Mitochondrien

Schematische Übersicht über den Eintransport von Vorstufenproteinen in Mitochondrien und Verteilung der Vorstufenproteine auf die verschiedenen mitochondrialen Subkompartimente.

In der mitochondrialen Außenmembran befindet sich der sog. TOM-Komplex (Translocase of the Outer Membrane), der die Translokation der Vorstufenproteine über und in die Außenmembran katalysiert. In der Innenmembran sitzen zwei aus mehreren Proteinkomponenten aufgebaute Komplexe, von denen der eine, der TIM23-Komplex (Translocase of the Inner Membrane), Vorstufenproteine über die Membran in die Matrix transloziert, während der andere, der TIM22-Komplex, die Insertion einer Subklasse von Membranproteinen in die Innenmembran vermittelt. Der Oxa1-Komplex ist ein in der mitochondrialen Innenmembran lokalisierter Proteinkomplex, der die Insertion von Proteinen von der Matrix her in die Innenmembran erleichtert.

Außerhalb der Mitochondrien liegen mitochondriale Vorstufenproteine als mehr oder weniger gefaltete Polypeptidketten vor. Es wird zwischen zwei Arten von Vorstufenproteinen unterschieden: Die eine ist dadurch charakterisiert, daß sie eine Präsequenz aufweist, die bevorzugt von den Außenmembranrezeptoren Tom20 und Tom22 im TOM-Komplex erkannt wird. Sie wird durch den TOM-Komplex über die Außenmembran und den Tim23-Komplex über die Innenmembran weiter in die Matrix transportiert. Die andere Art von Vorstufenproteinen weist interne Signalsequenzen auf. Sie wird bevorzugt von der Rezeptorkomponente Tom70 erkannt. Dann inseriert sie entweder in die Außenmembran oder mit Hilfe im Intermembranraum lokalisierter Komplexe aus Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 und Tim13 und dem Tim22-Komplex in die Innenmembran.

Bei Vorstufenproteinen mit aminoterminaler Präsequenz wird die Präsequenz mit Hilfe des Membranpotentials durch einen aus Tim17, Tim23 und Tim44 bestehenden TIM23-Komplex über die Innenmembran transloziert. Durch sukzessive, ATP-verbrauchende Bindung von mitochondrialem Hsp70 in Verbindung mit Tim44 und dem Co-Chaperon MGE wird schließlich der C-terminale Rest des Vorstufenproteins in die Matrix eintransportiert.

Die Zahlen geben das apparente Molekulargewicht der einzelnen Komponenten an.

In der Außenmembran sitzt ein aus mehreren Proteinkomponenten aufgebauter Komplex, der die Insertion von Vorstufenproteinen in und die Translokation von Vorstufenproteinen über die Außenmembran vermittelt (Kiebler *et al.*, 1990). Er wird TOM-Komplex genannt (Translocase of the Outer Membrane). In der Innenmembran sitzen zwei aus mehreren Proteinkomponenten aufgebaute Komplexe, von denen der eine, der TIM23-Komplex (Translocase of the Innner Membrane), Vorstufenproteine über die Membran in die Matrix transloziert, während der andere, der TIM22-Komplex, die Insertion einer Subklasse von Membranproteinen in die Innenmembran vermittelt (Bauer *et al.*, 2000). Ein weiterer Proteinkomplex in der mitochondrialen Innenmembran, der Oxa1-Komplex, vermittelt die Insertion von Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran (Hell *et al.*, 1998).

1.2 Eigenschaften von mitochondrialen Vorstufenproteinen

Der überwiegende Teil der mitochondrialen Vorstufenproteine wird mit einer aminoterminalen Signalsequenz synthetisiert, die die notwendige und hinreichende Information zur richtigen Lokalisation in den Mitochondrien enthält. Präsequenzen, die für eine Lokalisierung in der mitochondrialen Matrix verantwortlich sind, bestehen aus 20-60 Aminoacylresten, darunter vielen basischen und nur wenigen bis gar keinen sauren Aminoacylresten. Auf Grundlage von Strukturvorhersagen und NMR-Studien wird angenommen, daß diese Präsequenzen, besonders in Wechselwirkung mit negativen Ladungsträgern, so beispielsweise an Phospholipidmembranen, amphipathische Helices bilden können (von Heijne, 1986; Wang and Weiner, 1993; Abe *et al.*, 2000). Die meisten dieser aminoterminalen Präsequenzen werden in der mitochondrialen Matrix von spezifischen Proteasen abgespalten.

Es gibt auch Vorstufenproteine mit zwei aminoterminalen Präsequenzen. Während die eine Vorstufenproteine zunächst in die Matrix dirigiert, ist die zweite für die nachfolgende Sortierung aus der Matrix in den Intermembranraum verantwortlich. Die erste Präsequenz wird in der Matrix,

die zweite im Intermembranraum abgespalten. Ein Beispiel für solch ein Vorstufenprotein ist Cytochrom b_2 aus Hefe (Klaus *et al.*, 1996).

Eine Besonderheit bilden Vorstufenproteine mit carboxyterminaler Signalsequenz. Wie am Beispiel der DNA-Helikase Hmi1p der Hefe gezeigt, werden sie entfaltet mit dem C-Terminus zuerst in die Mitochondrien eintransportiert (Lee *et al.*, 1999).

Vorstufenproteine mit anderen Importsignalen tragen diese intern und weisen davon oft mehrere auf. Diese Importsignale werden nicht prozessiert. Vertreter dieser Klasse von Vorstufenproteinen sind insbesondere die integral in der Innenmembran lokalisierten Mitglieder der ADP/ATP-Carrier-Familie. Sie enthalten drei Domänen mit interner Sequenzhomologie, von der jede eine charakteristische Importsequenz mit hydrophoben und geladenen Aminoacylresten trägt (Sirrenberg *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1999).

1.3 Vorstufenproteine im Cytosol

Bevor ein Vorstufenprotein in die Mitochondrien eintransportiert wird, muß es an cytosolischen Ribosomen synthetisiert, um dann zum Mitochondrium verbracht zu werden.

In welchem Umfang der Import von Vorstufenproteinen in die Mitochondrien posttranslational oder cotranslational erfolgt, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Klar ist, daß sich an Mitochondrien gebundene Ribosomen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen finden lassen. So gibt es die Theorie, Polysomen würden gleich nach Austritt der ersten naszierenden Polypeptidkette zu den Mitochondrien hingeleitet und bänden an sie, wo dann der Import der Vorstufenproteine cotranslational erfolgte (Verner, 1993; Lithgow, 2000). Andererseits zeigen theoretische Überlegungen, daß der cotranslationale Import nur einen geringen Anteil am Gesamtimport von Vorstufenproteinen in die Mitochondrien haben kann, da die Gesamtmenge an zu importierendem Protein cotranslational nicht schnell genug synthetisiert werden kann (Neupert, 1997). Der Hauptanteil des Imports von Vorstufenproteinen in die Mitochondrien muß also posttranslational ablaufen.

Für den posttranslationalen Importweg gibt es Hinweise, daß die Sortierung der am Ribosom synthetisierten Proteine mit dem Austritt der naszierenden Polypeptidkette aus dem Ribosomentunnel eingeleitet wird (Wiedmann *et al.*, 1994; Neupert and Lill, 1994; George *et al.*, 1998; Funfschilling and Rospert, 1999). Die synthetisierten Polypeptidketten werden bereits hier als „mitochondrial“ erkannt und von molekularen Chaperonen, wie dem cytosolischen Hsp70, in einer „importkompetenten“ Form gehalten (Deshaies *et al.*, 1988; Murakami *et al.*, 1988).

Wie die Vorstufenproteine auf dem posttranslationalen Importweg schließlich zu den Mitochondrien gelangen, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Nur wenige, in spezielle Fälle involvierte Proteinfaktoren sind bis jetzt gefunden worden, die die Sortierung von Vorstufenproteinen zu den Mitochondrien fördern. Dazu gehört der in Ratten gefundene „Mitochondrial import stimulating factor“ MSF, ein Heterodimer aus einer 30 kDa- und einer 32 kDa-Untereinheit, der an bestimmte mitochondriale Vorstufenproteine bindet und deren Import stimuliert (Hachiya *et al.*, 1995, Mihara and Omura, 1996).

1.4 Translokation der Vorstufenproteine über die mitochondriale Außenmembran

Damit mitochondriale Vorstufenproteine in die Mitochondrien gelangen können, ist der TOM-Komplex in der Außenmembran notwendig.

Am besten wurden in den vergangenen Jahren die Proteintranslokasen der mitochondrialen Außenmembran aus den Pilzen *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* untersucht. Beide bestehen aus einer Reihe von Proteinkomponenten. Beide sind in ihrer Zusammensetzung und Funktion sehr ähnlich. Ihre Molekülmassen liegen im Bereich zwischen 400-600 kDa (Kiebler *et al.*, 1990; Dekker *et al.*, 1996; Dekker *et al.*, 1998).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit TOM-Komplexen höherer Eukaryonten (Goping *et al.*, 1995, Nuttall *et al.*, 1997, Bauer *et al.*, 1999, Suzuki *et al.*, 2000). Während die TOM-Proteintranslokase der Ratte mit einer Molekülmasse von etwa 400 kDa vermutlich ähnlich aufgebaut ist wie die der Pilze *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* (Suzuki *et al.*,

2000), scheinen die Außenmembrantranslokasen der Pflanzen *Arabidopsis* und Kartoffel mit einer Masse von nur etwas 230 kDa einfacher strukturiert zu sein (Jansch *et al.*, 1998; Werhahn *et al.*, 2001).

Im folgenden wird zusammengefaßt, welche Daten zur Struktur und Funktion der TOM-Komplexe von *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* Grundlage für die vorliegende Arbeit bildeten.

1.4.1 Die Komponenten des TOM-Komplexes

Es sind heute die Proteinsequenzen der Tom-Komponenten verschiedener TOM-Komplexe, zum Teil recht unterschiedlicher eukaryontischer Organismen bekannt: Tom71, Tom70, Tom40, Tom37, Tom22, Tom20, Tom7, Tom6 und Tom5 (Abb.2). Nicht alle wurden allerdings in allen bisher untersuchten Organismen gefunden. Während der TOM-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae* alle genannten Komponenten enthält, wurden in *Neurospora crassa* weder ein Tom71, Tom37 oder Tom5 nachgewiesen.

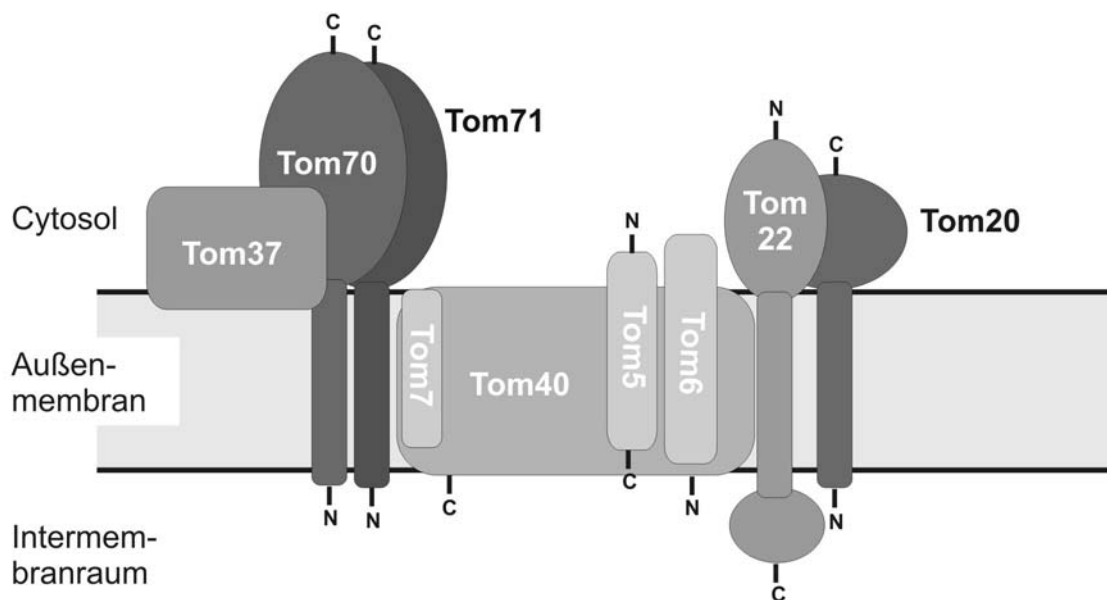


Abbildung 2: Komponenten und Topologie des TOM-Komplexes

Die Komponenten des Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* sind angegeben. Der Komplex in *Neurospora crassa* enthält nicht Tom71 und Tom37. Die Lokalisation der Amino- und Carboxytermini ist, sofern sie experimentell belegt werden konnte, angegeben. Sie gilt auch für *Neurospora crassa*.

Unter allen Tom70-Proteinen ist die C-terminale Domäne stark konserviert. Sie enthält mehrere sogenannte TPR-Sequenzmotive (aus dem Englischen: tetratricopeptide repeat), die vermutlich für Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Komponenten des TOM-Komplexes oder mit Vorstufenproteinen wichtig sind (Lamb *et al.*, 1995; Haucke *et al.*, 1996). Ansonsten zeigt der Vergleich der Proteinsequenzen der anderen Tom-Komponenten aus unterschiedlichen Organismen, wie am Beispiel der TOM-Komponente Tom40 gezeigt (Abb.3), eher moderate Übereinstimmungsraten auf.

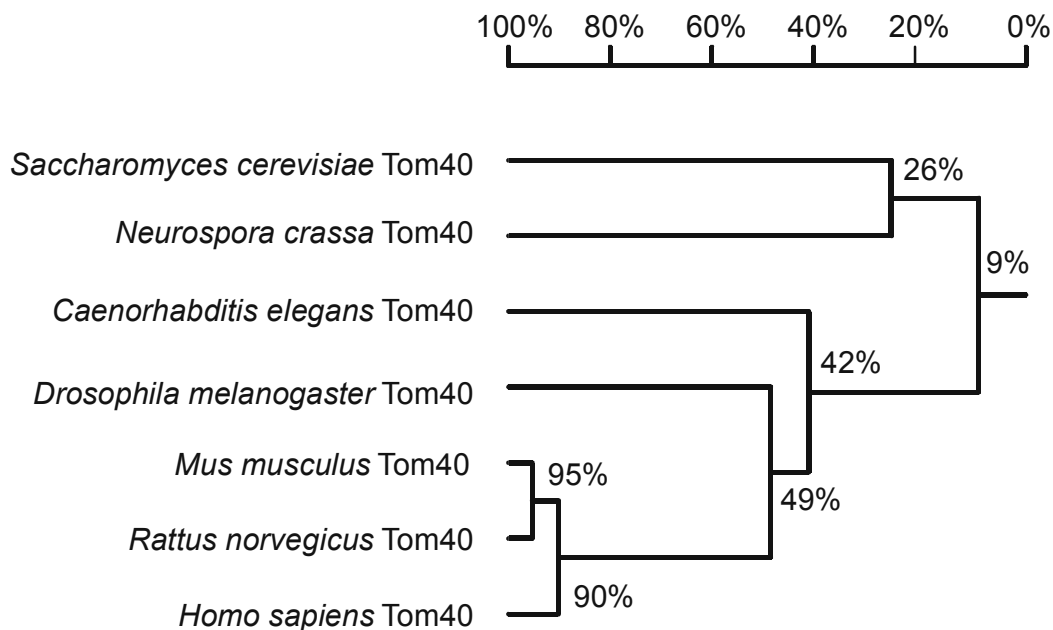


Abbildung 3: Baumdiagramm der Homologie der Primärstruktur bekannter Tom40-Proteine

Sequenzvergleich von Tom40 aus Hefe, *Neurospora crassa*, *C. elegans*, Fruchtfliege, Maus, Ratte und Mensch. Die Prozentangaben beziehen sich auf Identität in den Aminoacylresten der Sequenzen.

Genetische Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* haben ergeben, daß Tom40 eine essentielle Komponente ist (Vestweber *et al.*, 1989). Auch Tom22 ist weitgehend essentiell. Eine gewöhnliche Disruption des Tom22-Gens in *Saccharomyces cerevisiae* war letal (Lithgow *et al.*, 1994a; Dietmeier *et al.*, 1997). Alle anderen Tom-Komponenten sind als einzelne entbehrlich. Die Disruption des Tom20-Gens führte beispielsweise nur zu einem Pet-Phänotyp (Ramage *et al.*, 1993). Die Deletion des Tom70-Gens oder des Tom71-Gens beeinträchtigte nur das Zellwachstum auf nichtfermentierbaren

Kohlenstoff-Quellen bei erhöhten Temperaturen. Auch die Deletion des Tom37-Gens zeigte kaum Effekt (Gratzer *et al.*, 1995). Allerdings waren Doppelmutanten mit disruptierten Tom20- und Tom37-Genen bzw. Tom37- und Tom70-Genen letal (Gratzer *et al.*, 1995). Doppelmutanten mit disruptierten Tom20- und Tom70-Genen wiesen signifikante Wachstums- und mitochondriale Importdefekte auf (Lithgow *et al.*, 1994b).

In *Neurospora crassa* ergaben genetische Untersuchungen ein ganz ähnliches Bild: Auch in diesem Organismus wurden die Gene für Tom40 und Tom22 als essentiell eingestuft (Nargang *et al.*, 1995). *Neurospora crassa*-Stämme ohne Tom20 wuchsen schlechter als der Wildtyp-Stamm, waren aber lebensfähig (Harkness *et al.*, 1994a; Harkness *et al.*, 1994b).

Topologische Untersuchungen an einzelnen Tom-Komponenten (Abb.2) in *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* haben ergeben, daß Tom40 und die kleinen Komponenten Tom5, Tom6 und Tom7 tief in der äußeren Mitochondrienmembran eingebettet sind. Tom70, Tom22 und Tom20 weisen nur jeweils eine Transmembranregion auf (Kiebler *et al.*, 1990). Bei Tom70 und Tom20 liegen die N-Termini im Intermembranraum. Beide Proteine exponieren eine C-terminale Region von 65 bzw. 17 kDa zum Cytosol (Söllner *et al.*, 1990). Tom22 – mit dem C-Terminus im Intermembranraum und dem N-Terminus im Cytosol – enthält auf beiden Seiten der äußeren Mitochondrienmembran größere, hydrophile Domänen (Kiebler *et al.*, 1993).

Auf Grundlage von NMR-Studien ist bekannt, daß die cytosolische Domäne von Tom20 aus *Rattus norvegicus* (Abe *et al.*, 2000) und die kleine cytosolische Domäne von Tom5 vorwiegend α -helikal strukturiert sind (Hammen and Weiner, 2000). Über die Sekundärstruktur der anderen Tom-Komponenten ist nicht viel bekannt. Für die Struktur von Tom40 sowohl aus *Saccharomyces cerevisiae* als auch aus *Neurospora crassa* gibt es nur Vermutungen. Da das Protein weitgehend in der Lipiddoppelschicht eingelassen ist, die Proteinsequenz aber kaum hydrophobe Bereiche aufweist, die membrandurchspannende α -Helices bilden könnten, wurde die Hypothese aufgestellt, es handle sich bei Tom40 um ein dem mitochondrialen Porin (Shao *et al.*, 1996) oder den bakteriellen Porinen ähnlich gefal-

tetes Protein, das vornehmlich antiparallele, amphipathische β -Faltblatt-Strukturen aufweise (Court *et al.*, 1995, Mannella *et al.*, 1996).

1.4.2 Funktion der einzelnen Tom-Komponenten

Es kann als gesichert gelten, daß der TOM-Komplex folgende Aufgaben erfüllt: Er erkennt zu importierende Vorstufenproteine. Er bindet diese und transloziert Teile über die äußere Mitochondrienmembran (Mayer *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist er an der Insertion von Vorstufenproteinen in die äußere Mitochondrienmembran beteiligt (Krimmer *et al.*, 2001).

Funktionelle Studien haben gezeigt, daß die Proteine Tom71, Tom70, Tom22 und Tom20 für die Rezeptorfunktion des Komplexes wichtig sind. Vorstufenproteine konnten während des Imports im TOM-Komplex arretiert und chemisch mit Tom70, Tom20 und Tom22 vernetzt werden (Söllner *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1999). An Tom20 banden bevorzugt Vorstufenproteine mit aminoterminaler Signalsequenz. Mit Tom70 interagierten bevorzugt Vorstufenproteine mit interner Signalsequenz (Söllner *et al.*, 1989; Söllner *et al.*, 1990). *In vitro*-Bindungsversuche von Vorstufenproteinen mit internen und aminoterminalen Signalsequenzen an die cytosolischen Domänen von Tom20 und Tom70 aus *Saccharomyces cerevisiae* bestätigten die unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptoren für die beiden Klassen von Vorstufenproteinen (Brix *et al.*, 1999). Gemäß NMR-Studien an der cytosolischen Domäne von Tom20 aus *Rattus norvegicus* in Anbindung mit Präsequenzpeptiden beruht die Erkennung und Bindung im wesentlichen auf hydrophoben Wechselwirkungen (Abe *et al.*, 2000; Schleiff and Turnbull, 1998a). Mit Antikörpern gegen Tom22 ließ sich der Import fast aller untersuchter Vorstufenproteine hemmen (Kiebler *et al.*, 1993). Tom22 gilt daher als Vorstufenrezeptor in zentraler Position. Die Interaktion zwischen Präsequenzpeptiden und der cytosolischen Domäne von Tom22 beruht mehr auf ionischen als auf hydrophoben Wechselwirkungen (Brix *et al.*, 1997).

Mit GIP (General import pore) wird die Translokationspore für die Vorstufenproteine bezeichnet. Zu diesem Teil des TOM-Komplexes gehört Tom40. Den Nachweis dafür lieferten elektrophysiologische Untersuchungen

an rekombinantem Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae*, das in der Lage ist, in Lipiddoppelmembranen zu inserieren und Kanäle zu bilden (Hill *et al.*, 1998). Die Kanäle zeichneten sich durch eine leichte Kationen-Selektivität aus. Ihr Durchmesser wurde elektrophysiologisch mittels der Polymer-Ausschluß-Methode (Hill *et al.*, 1998) und durch Importstudien mit an Präsequenzen gekoppeltem Nanogold und Undecagold-Clustern (Schwartz and Matouschek, 1999) auf größer als 2 nm und kleiner als 2,6 nm bestimmt. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß sich der Tom40-Kanal durch Präsequenzpeptide spezifisch schließen ließ (Hill *et al.*, 1998).

Die Funktion der kleinen Tom-Komponenten Tom5, 6 und 7 in der GIP ist noch nicht gut verstanden. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es Hinweise darauf, daß Tom6 die Assemblierung des TOM-Komplexes fördert (Alconada *et al.*, 1995). Tom6 wurde in *Saccharomyces cerevisiae* als sog. high-copy suppressor eines temperatursensitiven Phänotyps in einem Stamm gefunden, der nur ein mutiertes Gen von Tom40 enthielt (Kassenbrock *et al.*, 1995). Das legt nahe, daß Tom6 funktionell mit Tom40 eng verbunden ist. Tom7 fördere hingegen die Dissoziation des Komplexes (Honlinger *et al.*, 1996). Tom5 ist Teil der GIP und kommt in transitorischen Kontakt mit Vorstufenproteinen (Söllner *et al.*, 1992; Dietmeier *et al.*, 1997).

Obwohl die Funktion der einzelnen Tom-Komponenten bereits weitgehend charakterisiert wurde, sind bislang noch keine eindeutigen Rückschlüsse auf den eigentlichen Mechanismus der Proteintranslokation möglich. Gefunden wurden bisher lediglich zwei verschieden affine Bindungszustände von Vorstufenproteinen am TOM-Komplex, die mit *cis*- und *trans*-Bindung bezeichnet wurden (Mayer *et al.*, 1995). Man geht davon aus, daß durch die Bindung hochaffiner Faktoren an das auf der Innenseite der Außenmembran austretende Polypeptid oder vom Membranpotential der Innenmembran weitere treibende Kräfte für die Translokation durch die Außenmembran zur Verfügung gestellt werden können (Herrmann and Neupert, 2000).

1.4.3 Der isolierte TOM-Komplex aus *Neurospora crassa*

In überaus eleganten Untersuchungen wurde der TOM-Komplex aus *Neurospora crassa* isoliert und strukturell wie funktionell charakterisiert (Künkele *et al.*, 1998a, Künkele *et al.*, 1998b und Künkele, 1999).

Der TOM-Komplex, bestehend aus Tom70, Tom40, Tom22, Tom20, Tom7 und Tom6, konnte mit Hilfe eines um sechs Histidinreste C-terminal verlängerten Tom22 als zusammenhängendes Ganzes direkt aus mitochondrialen Außenmembranvesikeln isoliert werden (Abb.4).

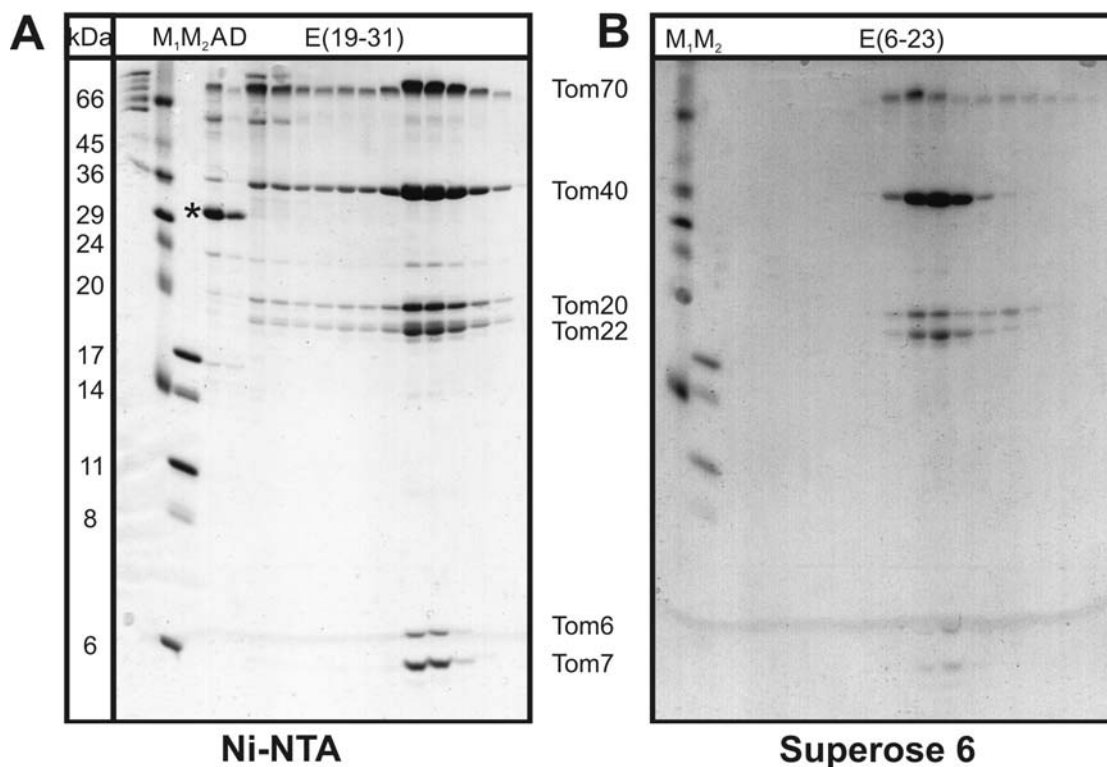


Abbildung 4: Isolierung von TOM-Komplex aus *N. crassa*

TOM-Komplex-Aufreinigung aus Außenmembranvesikeln eines *Neurospora crassa*-Stamms, der ein Hexahistidin-markiertes Tom22_{his6} enthielt. (A) Analyse des ersten Schritts der TOM-Komplex-Aufreinigung mittels SDS-PAGE. Dieser Schritt bestand in der Durchführung einer Ni-NTA-Säulenchromatographie, bei der das gebundene Protein mit Hilfe eines Imidazol-Gradienten eluiert wurde. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt. M1 und M2, Spuren mit Markerproteinen, deren Größe links angegeben ist; A, Auftrag; D, Durchlauf; *, Porin, die Hauptkomponente der Außenmembranvesikel; E(19-31), Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule. (B) Analyse des zweiten Schritts der TOM-Komplex-Aufreinigung mittels SDS-PAGE. Bei diesem Schritt handelte es sich um eine Gelfiltrationschromatographie von dem vereinigten Eluat der Hauptfraktionen des ersten Schritts. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt. M1 und M2, Spuren mit Markerproteinen, deren Größe links angegeben ist; E(6-23), Elutionsfraktionen von der Superose 6-Gelfiltrationssäule (nach Künkele *et al.*, 1998a).

Die Molekülmasse dieses Komplexes lag bei 550-600 kDa. Die Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses radioaktiv markierter Einzelkomponenten in diesem isolierten TOM-Komplex ergab ein molares Verhältnis zwischen Tom70, Tom40, Tom22 und Tom20 von etwa 1,5:8:3:2. Die Anzahl der Untereinheiten Tom6 und Tom7 konnte nicht bestimmt werden.

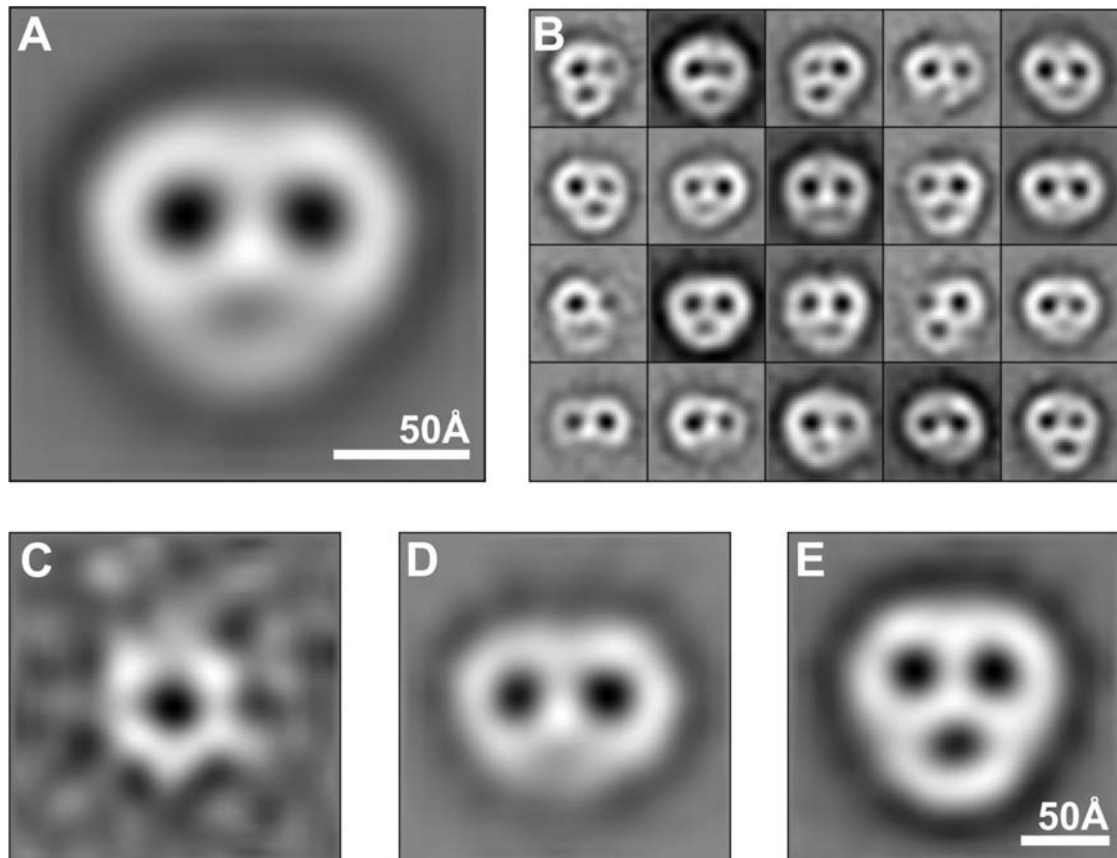


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Einzelpartikelanalyse des Tom-Komplexes aus *Neurospora crassa*

(A) Gemitteltetes Bild elektronenmikroskopischer Aufnahmen einzelner, negativ kontrastierter TOM-Komplex Partikel. (B) Basierend auf sog. Eigenbildanalysen wurden die Bilddatensätze in 20 Klassen unterteilt. Sie unterscheiden sich im wesentlichen durch die Anzahl ihrer Poren. (C-E) Nach erneutem Bildvergleich können übergeordnete Gruppen mit einer (C), zwei (D) oder drei (E) Poren unterschieden werden. Die erste Gruppe mit einer Pore umfaßte 54, die zweite 875 und die dritte 613 Einzelpartikel (nach Künkele *et al.*, 1998a).

Der isolierte TOM-Komplex ließ sich in Lipidvesikel rekonstituieren und seine Funktionalität durch Import von mitochondrialen Vorstufenproteinen in die entstandenen Proteoliposomen zeigen. Das heißt, die Komponenten,

die aus den Mitochondrien isoliert wurden, waren in der Lage, den Import von Vorstufenproteinen über die mitochondriale Außenmembran zu vermitteln.

Auf der Grundlage elektrophysiologischer Studien konnte belegt werden, daß der isolierte TOM-Komplex Kanäle bildet. Wie die Kanäle von rekombinant exprimierten Hefe-Tom40 wiesen die TOM-Komplex-Kanäle eine leichte Kationenselektivität auf. Des weiteren zeigten Einzelkanalmessungen, daß die vom isolierten TOM-Komplex gebildeten Kanäle drei verschiedene Leitfähigkeitsniveaus aufwiesen. Mit zunehmender Spannung tendierten sie dazu zu schließen (Künkele *et al.*, 1998b).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten, negativ kontrastierten TOM-Komplex-Einzelpartikeln ergaben Bilder mit ein, zwei und drei kontrastreichen Bereichen, die als Poren bzw. Kanäle gedeutet wurden. Der Gesamtdurchmesser der Partikel betrug ca. 13,8 nm, der einer „Pore“ ca. 2,0 nm (Abb.5).

1.5 Translokation von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Innenmembran und die Matrix

Wenn Vorstufenproteine nicht ihre Lokalisation in der Außenmembran der Mitochondrien haben oder von Cofaktoren im Intermembranraum gebunden werden, werden sie nach Übertritt durch die mitochondriale Außenmembran von den kleinen Tim-Proteinen im Intermembranraum und/oder den TIM-Komplexen der Innenmembran empfangen und weitergeleitet (Bauer *et al.*, 2000; Koehler, 2000; Pfanner and Geissler, 2001; Abb.1). Die kleinen Tim-Proteine Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 und Tim13 weisen Homologien untereinander auf und sind sämtlich Zinkfingerproteine (Sirrenberg *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2000).

Bei Vorstufenproteinen mit aminoterminaler Präsequenz wird die Präsequenz mit Hilfe des Membranpotentials durch den TIM23-Komplex über die Innenmembran transloziert. Er besteht aus den Proteinkomponenten Tim17, Tim23 und Tim44 (Moro *et al.*, 1999). Durch sukzessive, ATP-verbrauchende Bindung von mitochondrialem Hsp70 in Verbindung mit Tim44 und dem Co-Chaperon MGE wird der C-terminale Rest des Vorstufenproteins in die

Matrix eintransportiert (Voisine *et al.*, 1999). Anschließend wird die Präsequenz von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten, woraufhin sich das Protein – zumeist mit Hilfe der mitochondrialen Hsp60/Hsp10-Chaperon-Maschinerie – in die endgültige Struktur faltet (Hawlitschek *et al.*, 1988).

Vorstufenproteine der ADP/ATP-Carrier-Familie werden von heterooligomeren 70 kDa-Komplexen, bestehend aus den essentiellen Zinkfingerproteinen Tim9, Tim10 und Tim12, zum TIM22-Komplex geleitet (Sirrenberg *et al.*, 1998). Dieser besteht aus den Proteinkomponenten Tim18, Tim22 und Tim54 (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Er ermöglicht die Insertion dieser Vorstufenproteine in die Innenmembran. Dazu ist das Membranpotential notwendig (Endres *et al.*, 1999).

Der im Intermembranraum lokalisierte, heterooligomere Tim8/Tim13-Komplex ist in *Saccharomyces cerevisiae* nicht essentiell. Er ist in den Import von manchen Vorstufenproteinen in die Mitochondrien involviert, z.B. Tim23. Seine genaue Funktion ist allerdings noch unklar (Koehler *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000).

Der Oxa1-Komplex katalysiert die Insertion von Vorstufenproteinen von der Matrix her in die Innenmembran. Ein Beispiel dafür ist die in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial exprimierte Cytochromoxidase-Untereinheit II im Komplex IV der Atmungskette (Hell *et al.*, 1997). Aber auch kernkodierte Vorstufenproteine werden über den Oxa1-Komplex in die Innenmembran inseriert, z.B. das Oxa1p selbst (Hell *et al.*, 1998). Inzwischen wurde in YidC ein bakterielles Homolog zum mitochondrialen Oxa1p gefunden. Dieses, am Export bakterieller Proteine beteiligte Membranprotein stellt das erste bekannte bakterielle Homolog eines der am mitochondrialen Import beteiligten Proteine dar (Samuelson *et al.*, 2000).

Die Importwege der Vorstufenproteine in die Mitochondrien haben sich nach neuesten Untersuchungen als durchaus vielfältig erwiesen, obwohl sie die bekannten Proteinkomponenten beinhalten, so daß sich diese Wege der im Vorhergehenden angedeuteten Klassifizierung immer mehr entziehen (Pfanner and Geissler, 2001).

1.6 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Grundfrage dieser Arbeit war folgende: Wie ist der TOM-Komplex in *Neurospora crassa* aufgebaut und wie lässt sich seine Funktion aus der Struktur erklären? Die bisher aufgeführten Befunde gaben hierzu lediglich erste Einsichten. So wurden für den TOM-Komplex nicht nur Partikel mit drei, sondern in gleichem Maße mit zwei potentiellen Poren im elektronenmikroskopischen Bild gefunden. Es blieb die Frage, welche dieser Bilder die Grundstruktur des TOM-Komplexes darstellen und woraus diese Grundstruktur besteht. Anders formuliert lautete darum die Grundfrage dieser Arbeit: Welche Komponenten des TOM-Komplexes bilden die Generelle Importpore? Die Beantwortung dieser Frage schloß die Behandlung folgender Punkte mit ein:

- Welchen Anteil hat Tom40 als Hauptkomponente der Generellen Importpore und welchen Anteil haben die Rezeptoren an der Struktur des TOM-Komplexes?
- Entsprechen die in den elektronenmikroskopischen Projektionsbildern des TOM-Komplexes sichtbaren potentiellen Poren dem Proteintranslokationskanal?
- Welche Sekundärstruktur weisen die Komponenten der Generellen Importpore auf, speziell die Hauptkomponente Tom40?
- Sind noch weitere, bisher nicht bekannte Komponenten im TOM-Komplex identifizierbar?
- Wie ist die Stöchiometrie der kleinen Tom-Komponenten im TOM-Komplex?
- Wie wichtig sind die Rezeptorkomponenten Tom70, Tom20 und Tom22 für die Erkennung und Bindung von Vorstufenproteinen?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst neue Strategien zur Isolierung und Aufreinigung des TOM-Komplexes aus *Neurospora crassa* und verschiedener Subkomplexe dieses Komplexes entwickelt. Anschließend wurden die aufgereinigten TOM-Komplexe und TOM-Subkomplexe biochemisch, spektroskopisch und strukturell charakterisiert.

Elektrophysiologische Methoden ergänzten die biochemische Charakterisierung und lieferten weitere Grundlagen zur Beschaffenheit der Translokationspore in der mitochondrialen Außenmembran.

2 Materialien und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden weitgehend durchgeführt, wie von Sambrook *et al.*, 1989 beschrieben.

2.1.1 Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine und als Ausgangspunkt der im folgenden beschriebenen Klonierungen wurden Plasmide der pGEM-Reihe (Promega) verwendet, die die betreffende cDNA unter Kontrolle des SP6-Promotors enthielten.

Für die Klonierung eines in *Saccharomyces cerevisiae* transformierbaren Vektors wurde vom pVT102U-Vektor ausgegangen, der sowohl von *E. coli* als auch von *Saccharomyces cerevisiae* transskribiert werden kann und für die Selektion von *Saccharomyces cerevisiae*-Sämlingen ein URA3-Gen enthält (Vernet *et al.*, 1987).

Für die rekombinante Expression von Su9-DHFR wurden zwei Konstrukte verwendet. Die Plasmide bestanden aus dem Grundkörper des pQE40-Plasmids (Quiagen) und enthielten das Gen für die Signalsequenz der Untereinheit 9 der F₀F₁-ATPase (Aminoacylreste 1-69 oder 1-49) aus *Neurospora crassa* plus die Dihydrofolatreduktase aus Maus mit einem Cystidylrest und abschließender 6xHistidin-Erweiterung am Carboxyterminus.

2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Bei der Präparation größerer

Mengen ("Maxi-Präp") wurde die DNA zusätzlich über eine Anionen-Austausch-Säule gereinigt.

2.1.2.1 Mini-Präparation

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden Bakterien aus 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Amp-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl; supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin) für 30 sec in einer Tischzentrifuge bei 3000 x g sedimentiert, in 100 µl GTE-Lösung (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v) wurden die Zellen lysiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurde mit 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8, neutralisiert, und nach 10 min Zentrifugation bei 14.000 x g der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA durch zwei Natriumacetat/Ethanol-Fällungen (siehe 2.1.4) gereinigt, aufkonzentriert und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

2.1.2.2 Maxi-Präparation

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis ca. 0,5 mg) wurde der "Jetstar"-Kit der Firma Genomed verwendet. Eine Anionen-Austausch-Säule wurde mit 30 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl, 100 mM Natriumacetat pH 5,0, 0,15 % Triton X-100) äquilibriert. Währenddessen wurden die Bakterien aus 200 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Medium mit Ampicillin durch 5 min Zentrifugation geerntet (5000 Upm, Beckman-JA10-Rotor). Die Zellen wurden in 10 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 10 ml Lösung E2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Das Zell-Lysat wurde durch Zugabe von 11 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat pH 5,5) neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 15.000 x g wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Es wurde mit 60 ml Lösung

E5 (0,8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat pH 5,0) gewaschen und mit 15 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation (15.000 x g, 30 min, 4°C) aus dem Eluat gefällt. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde einer OD von 1 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DANN zugrundegelegt (linearer Bereich: 0,1-1 OD).

2.1.4 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Durch Phenolextraktion wurden Proteine und andere Verunreinigungen, die sich in der Grenzschicht der wässrigen zur phenolischen Phase anreichern, aus der DNA-haltigen Lösungen entfernt. Dazu wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt.

Durch Präzipitation der wässrigen Phase mit Ethanol wurde DNA konzentriert und teilweise von unerwünschten Salzen befreit. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 10 M Natriumacetat auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt, oder, wenn einzelne Nukleotide abgetrennt werden sollten, mit 7,5 M Ammoniumacetat auf 2,5 M Ammoniumacetat. Anschließend wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol für 15 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Nach Waschen des DNA-Pellets mit 70 % Ethanol und Trocknen wurde die DNA in H₂O oder TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde mit Enzymen der Firmen Gibco/BRL, Appligene, New England Bio-labs und Boehringer Mannheim gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden mitgelieferten Puffern bei einer Enzymkonzentration von ca. 2-3 U pro μg DNA verdaut. Für Plasmid-DNA erwiesen sich Inkubationszeiten von einer Stunde in der Regel als ausreichend; genomische DNA und PCR-Produkte wurden über Nacht verdaut. Plasmid-DNA wurde bei einer Temperatur von 25°C (SmaI) beziehungsweise 37°C (alle anderen Restriktionsenzyme) für 1 h verdaut.

2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde T4-DNA-Ligase der Firma Gibco/BRL mit dem mitgelieferten Ligationspuffer verwendet (5 x Puffer: 0,25 M Tris/HCl pH 7,6, 50 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) PEG-8000). Es wurde 1 U Enzym für maximal 100 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 μl eingesetzt. Das Insert lag in der Regel in einem 2-5fachen molaren Überschuß gegenüber der Plasmid-DNA vor. Es wurde über Nacht bei 14°C, bei der Ligation von glatten Enden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase in einem programmierbaren Thermostaten vervielfältigt (Saiki *et al.*, 1988). Es wurde der "Prime Zyme"-Kit der Firma Biometra verwendet. Für 100 μl Reaktionsansatz wurden zusammengegeben: 2 μl einer Lösung mit einer Mischung aller vier Desoxyribonukleotide (je 10 mM), 10 μl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 15 mM MgCl_2 , 500 mM KCl, 1 % Triton X-100), ca. 1 μg jeden Primers, ca. 5 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng genomische *N. crassa* DNA als Matrize und 5 U Taq-DNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mine-

ralöl überschichtet. Im ersten Schritt des PCR-Prozesses wurde der Ansatz zum Denaturieren der Matrize auf 94°C aufgeheizt; diese Temperatur wurde im ersten Zyklus für 4 min, in den späteren Zyklen für 1 min gehalten. Im zweiten Schritt wurde für 1 min je nach Länge und G/C-Gehalt der Primer auf 35 bis 50°C abgekühlt, um die Anlagerung der Primer an die Matrize zu erlauben. Im dritten Schritt wurde der Ansatz auf die Synthesetemperatur von 72°C aufgeheizt, und diese Temperatur wurde je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments für 1 min bis 4 min gehalten. Nachdem dieser Zyklus 25 bis 35 mal durchlaufen war, wurde die amplifizierte DNA auf einem Agarosegel analysiert.

2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA wurde mit Gel-Auftragspuffer geladen (5x Gel-Auftragspuffer: 30 % (v/v) Glyzerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol). Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und betrug 0,8-2 %. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer (50x TAE: 242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA) bei einer Spannung von bis zu 13 V/cm. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde dem Gel beim Gießen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigegeben oder das Gel im Anschluß an den Laufvorgang 10 min in einer wässrigen Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, danach 10 min gewässert.

2.1.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch Elektrophorese in ein Hochsalz-Kissen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h in 0,5 x TAE-Puffer mit 5 V/cm in einer Kammer, in der sich auf der Anodenseite ein V-förmiger Kanal befand, der mit 75 µl bis 100 µl 3 M Natriumacetat ge-

füllt war. Die DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung aus der Salzlösung gewonnen.

2.1.10 Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA

Zur Herstellung elektroporationskompetenter *E. coli*-Zellen wurden 500 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl) mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur des entsprechenden Stammes (XL1-blue oder BL21) in LB angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 kultiviert. Dann wurde die Kultur auf Eis gekühlt, und alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Geräten durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 Upm, Beckman-JA10-Rotor) geerntet, dreimal mit 10 % (v/v) Glycerin gewaschen, in 0,5 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in 40 µl Portionen bei -70°C gelagert.

Die elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurden durch Elektroporation mit einem Bio-Rad "Gene Pulser" nach Angaben des Herstellers transformiert. 40 µl Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut, zusammen mit der DNA (1-2 µl Ligationsansatz oder 1 ng Plasmid-DNA) in eine Elektroporations-Küvette (0,2 cm) gegeben und durch einen Stromstoß transformiert (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 msec). Daraufhin wurden die Bakterien für 30-60 min bei 37°C unter Schütteln in SOC-Medium (2 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) inkubiert, durch eine kurze Zentrifugation in einer Tischzentrifuge gesammelt, in 200 µl Medium resuspendiert, auf eine LB-Amp Platte (LB mit 2 % Agar und 100 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die rekombinanten Bakterien wurden in 50 % (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

2.1.11 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit rekombinanter DNA

Zur Transformation von Hefezellen wurde die Lithiumacetat-Methode verwendet. Eine 50 ml-Kultur in YPD-Medium (vgl.2.8.2) wurde bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 geschüttelt. Dann wurden die Zellen geerntet (3000 x g, 3 min, Beckmann-JA20-Rotor), mit 25 ml sterilem H₂O gewaschen, in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und in einem Endvolumen von 500 µl in 0,1 M Lithiumacetat aufgenommen. 50 µl dieser Suspension wurden sedimentiert und mit 240 µl 50 % (w/v) PEG (MW 3350; Sigma), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl beschallter, hitzedenaturierter Lachsspermien-DNA (2mg/ml) und 50 µl (0,1-10 µg) zu transformierender DNA versetzt und gut gemischt. Danach wurde die Probe für 30 min bei 42°C im Heizblock geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen 15 sec sedimentiert, in 1 ml H₂O aufgenommen und sofort auf Selektivmedium (vgl. 2.8.2) ausplattiert.

2.1.12 Herstellung von Hefe- und *Neurospora crassa*-Stämmen mit einem Tom40 mit C-terminalem Hexahistidinyrest

2.1.12.1 Herstellung der Plasmide

Zur Transformation von *Neurospora crassa* mit einem Vektor, der das *Neurospora crassa* Tom40-Gen mit einer Erweiterung, die für 6 Histidylreste am Aminotermminus kodiert, wurde das Plasmid pQEncTOM40 konstruiert. Dazu wurde das PCR-Produkt, das mit dem pGEM4-ncTOM40-Vektor (Kiebler *et al.*, 1990) als Matrize und den Primern 5'-GCG GGA TCC ATG GCT TCG TTT TCC ACC-3' (enthält eine BamHI-Schnittstelle) und 5'-GCG AAG CTT GGA AAC CAA ATG CTG GCC-3' (enthält eine HindIII-Schnittstelle), erhalten wurde, in den mit BamHI und HindIII geschnittenen pQE30-Vektor ligiert (Abb.6). Die Richtigkeit des Vektors wurde durch XhoI und EcoRI/HindIII-Verdaus, sowie durch Sequenzierung überprüft und als

korrekt gefunden. Der Vektor enthält das *Neurospora crassa* Tom40_{his6}-Gen hinter dem GAL-Promotor und eine Ampicillinresistenz.

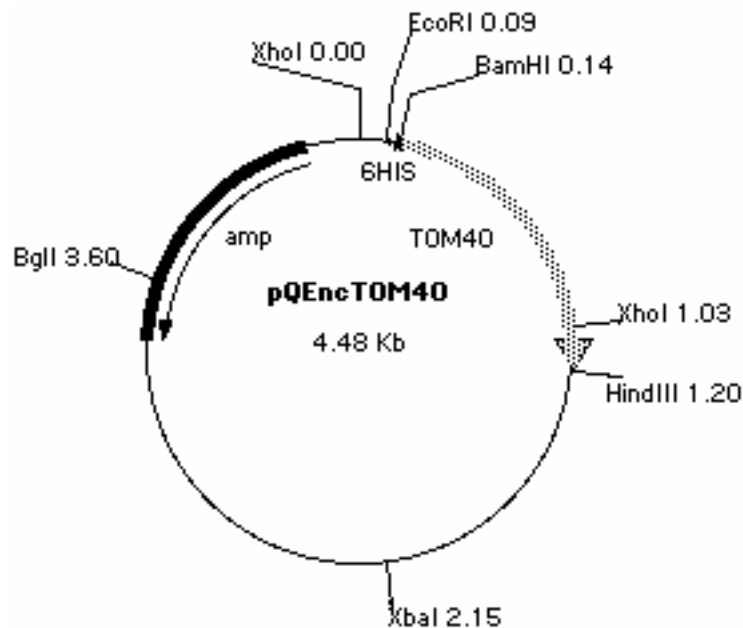


Abbildung 6: Karte des pQEncTOM40-Vektors

Der pQEyTOM40-Vektor wurde konstruiert, um das Tom40-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* mit einer für eine aminoterminalen Histidinerweiterung codierenden Appendix zu versehen. Ein PCR-Produkt, das mit dem pGEM4-yTOM40-Vektor (Vestweber *et al.*, 1989) als Matrize und den Primern 5'-GCG GGA TCC ATG TCTG CAC CAA CTC CA-3' (enthält eine BamHI-Schnittstelle) und 5'-GCG AAG CTT TCA CAA TTG AGG AAG AGC-3' (enthält eine HindIII-Schnittstelle), erhalten wurde, wurde in den mit BamHI und HindIII geschnittenen pQE30-Vektor ligiert (Abb.7). Die Richtigkeit des Vektors wurde durch XbaI und EcoRI/HindIII-Verdaus, sowie durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung ergab, daß sich im Tom40-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* eine Punktmutation befand, die einen konservativen Aminoacylrestaustausch in Position 178 zur Folge hat (Val -> Ala). Eine Sequenzierung der Matrize pGEM4-yTOM40 ergab, daß die Mutation schon dort vorlag. Dieser Vektor wurde aber schon seit langem für Proteinsynthese *in vitro* benutzt. Aus dem so hergestellten radioaktiven Lysat ließ sich das Tom40-Protein in Mitochondrien importieren und wird in den Komplex eingebaut. Der pQEyTOM40-Vektor enthält eine Ampicillinresistenz

und hinter dem GAL-Promotor das *Saccharomyces cerevisiae*-Tom40-Gen mit einer Erweiterung, die für 6 Histidylreste am N-Terminus kodiert.

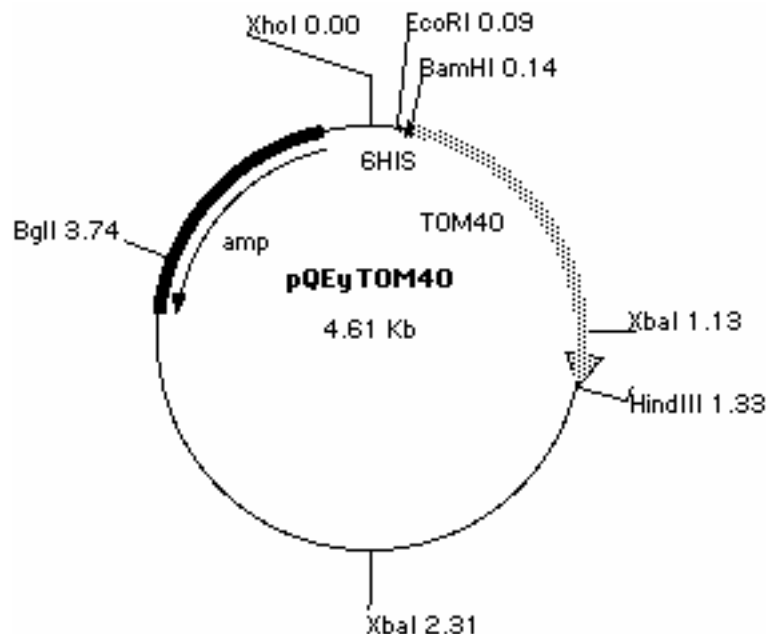


Abbildung 7: Karte des pQEyTOM40-Vektors

Zur Expression von Hefe-Tom40_{his6} in *Saccharomyces cerevisiae* wurde der pVT-yTOM40nh-Vektor konstruiert aus einem PCR-Produkt, das mit dem pQEyTOM40-Vektor als Matrize und den Primern 5'-GCG AGA TCT ATG AGA GGA TCG-3' (enthält eine BglII-Schnittstelle) und 5'-GCG AAG CTT TCA CAA TTG AGG AAG AGC-3' (enthält eine HindIII-Schnittstelle), erhalten wurde, und dem mit BamHI und HindIII geschnittenen pVT102U-Vektor (Abb.8). Die Richtigkeit des Vektors wurde durch Sequenzierung überprüft und als korrekt gefunden - abgesehen von der schon in der Matrize vorhandenen Punktmutation.

2.1.12.2 Herstellung der Hefe-Stämme mit einem Tom40 mit aminoterminaler 6xHis-Erweiterung

Der Vektor pVT-yTOM40nh (Abb.8) wurde nach 2.1.13 in den „Wildtyp“-Stamm 303α transformiert und so der Stamm UA-TH-32 erhalten.

Der Stamm zeigte ein Wachstumsverhalten wie der Ausgangsstamm. Die Fähigkeit zur Expression des Tom40_{his6} wurde getestet durch alkalischen

Aufschluß (siehe 2.2.7.1), anschließende SDS-PAGE und Dokoration des vom Gel erhaltenen Blots mit Anti-Tom40-Antikörpern.

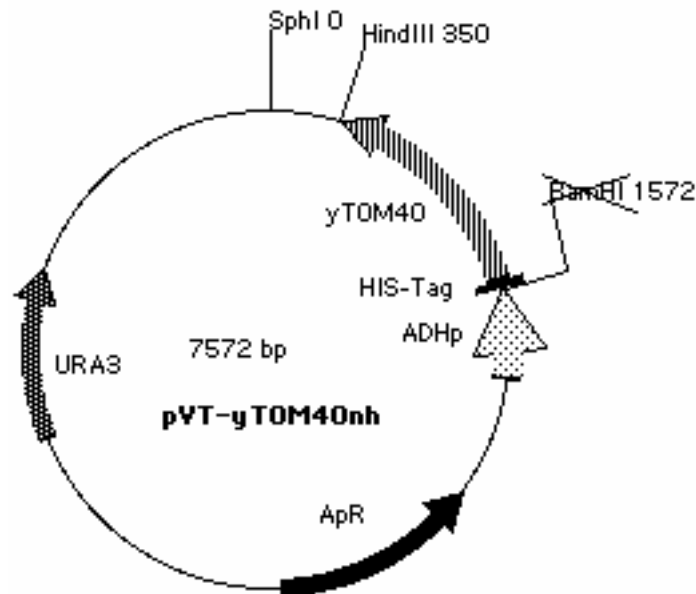


Abbildung 8: Karte des pVT-yTOM40nh-Vektors

In UA-TH-32 wurde Hefe-Tom40_{his6} in etwa äquimolaren Mengen neben dem endogenen Tom40 exprimiert. Die Güte der Mitochondrien aus UA-TH-32 wurde durch Import radiochemischer Mengen an Vorstufenprotein in aus diesem Stamm isolierte Mitochondrien *in vitro* getestet. Die Mitochondrien importierten unter Zugabe von 2 mM NADH und 2 mM ATP pSu9(1-69)-DHFR zu 58 % (n = 4) im Vergleich mit Mitochondrien aus dem Wildtyp-Hefestamm W303α, während sie AAC unter gleichen Bedingungen zu 120 % (n = 2) im Vergleich zu Mitochondrien aus dem Wildtypstamm W303α importierten. Dabei handelt es sich zwar nicht um signifikante Abweichungen, aber die Mitochondrien aus UA-TH-32 zeigen offenbar ein etwas anderes Importverhalten *in vitro* als Wildtypmitochondrien.

2.1.12.3 Herstellung von *Neurospora crassa*-Stämmen mit einem Tom40 mit N-terminalem Hexahistidinyrest

Die *Neurospora crassa*-Stämme U3-2-III und T40H-13-1 wurden von Frank Nargang in Edmonton (Kanada) mit Hilfe des in 2.1.12.1 hergestellten Plasmids pQEncTOM40 hergestellt

A) U3-2-III (siehe Abb.9):

Ausgegangen wurde von dem heterokaryontischen Stamm C4M29.

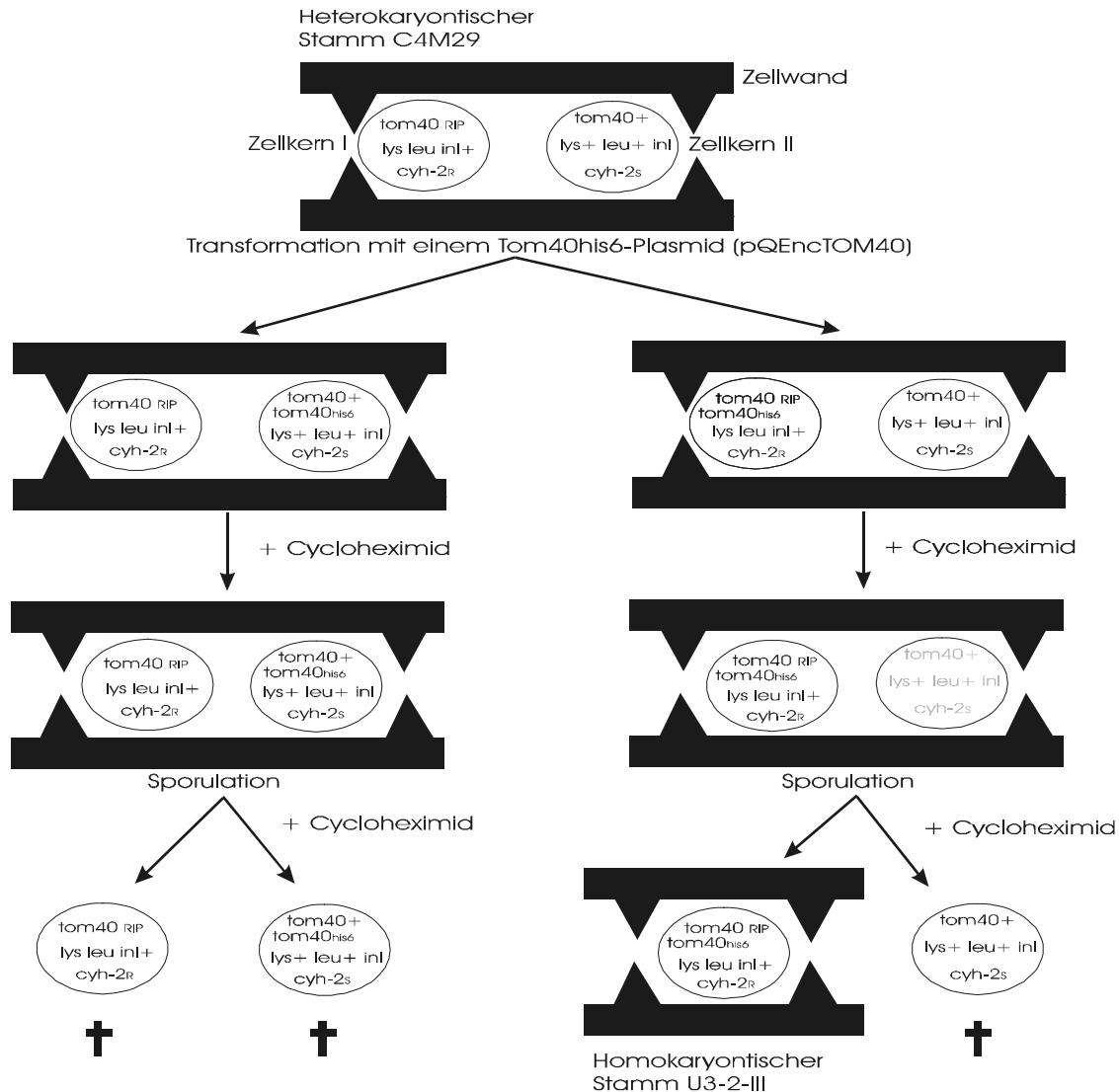


Abbildung 9: Schema der Herstellung des U3-2-III-Stammes

Der *Neurospora crassa*-Stamm, von dem ausgegangen wurde, war der heterokaryontische Stamm C4M29, der mit dem pQEncTOM40-Plasmid transformiert wurde. Dann erfolgte Selektion mittels Cycloheximid auf den homokaryonten U3-2-III-Stamm. *Tom40^{RIP}*: mittels RIP zerstörtes *Tom40*-Gen; *Tom40⁺*: intaktes *Tom40*-Gen; *lys⁺, leu⁺, inl⁺*: Fähigkeit zur Lysin-, Leucin- bzw. Inositol-Biosynthese; *lys, leu, inl*: Genetischer Defekt, der zum Verlust der Fähigkeit zur Lysin-, Leucin- bzw. Inositol-Biosynthese führt; *cyh^R*: Cycloheximid-Resistenz; *cyh^S*: Cycloheximid-Sensitivität.

Die eine Art Kerne war Cycloheximid-sensitiv und enthält ein normales *Neurospora crassa*-Gen. Die andere Art Kerne war cycloheximidresistent. In ihnen war das *Tom40*-Gen durch einen für *Neurospora crassa* spezifischen Gendisruptionsmechanismus, das sind durch Genverdopplung induzierte

Punktmutationen (RIP, repeat induced point mutation), zerstört worden.¹ Es mußte von diesem heterokaryontischen Stamm ausgegangen werden, da das Tom40-Gen in *Neurospora crassa* essentiell ist, homokaryontische Stämme ohne Tom40-Gen also nicht lebensfähig sein sollten.² Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid qQEncTOM40 (siehe 2.1.12.1, Abb.6) transformiert und anschließend mit Hilfe von Cycloheximid auf einen homokaryonten Stamm selektiert, der das Tom40_{his6}-Gen auf dem Plasmid neben dem durch RIP zerstörten originalen Tom40-Gen enthielt. Dieser homokaryonte Stamm war auxotroph für Leucin und Lysin, weil im Kern Gene von deren Syntheseezymen defekt waren.

Die Expression von Tom40 und Tom40_{his6} wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblotting untersucht und festgestellt, daß der Stamm U3-2-III Tom40_{his6} in äquimolaren Mengen exprimiert wie das Tom40 in nativer Größe. Offenbar wurde mit Cycloheximid nicht nur auf den cycloheximidresistenten Kern selektioniert. Der Stamm konnte jedoch für die Isolierung von Tom40_{his6} aus Außenmembranvesikeln verwendet werden. Natives Tom40 ging dabei verloren, wenn zur Solubilisierung der Außenmembranvesikel das Detergens Triton X-100 verwendet wurde (siehe unten).

B) T40H-13-1 (siehe Abb.10):

Um einen *Neurospora crassa*-Stamm zu kreieren, der nur Tom40_{his6} exprimiert und nicht auch das native Tom40, wurde von einem anderen heterokaryontischen Stamm (F46B-2) ausgegangen, der die gleichen Eigenschaften hatte wie der Stamm C4M29. Der F46B-2-Stamm wurde mit einem *Neurospora crassa*-Vektor, einem Plasmid, der das Tom40_{his6}-Gen und eine zusätzliche Bleomycin-Resistenz enthielt,³ transformiert. Anschließend wurde mit Hilfe von Cycloheximid und Bleomycin auf einen homokaryonten Stamm selektiert, der das Tom40_{his6}-Gen auf dem Plasmid neben dem durch RIP zerstörten originalen Tom40-Gen enthielt. Auch dieser homokaryonte

¹ Zu heterokaryonten Stämmen von *Neurospora crassa* und zur Methode siehe Davis and De Serres, 1970 und Metzenberg and Grotelueschen, 1992.

² Eine solche Disruption nennt man eine „geschützte“ Disruption (im Englischen: „sheltered Disruption“) bzw. „sheltered RIP“. Zur Methode siehe Nargang *et al.*, 1995.

³ Dieses Plasmid wurde von Frank Nargang aus dem Plasmid pQEncTOM40 (siehe oben) hergestellt.

Stamm war auxotroph für Leucin und Lysin. Dieser Stamm exprimierte nur Tom40_{his6}.

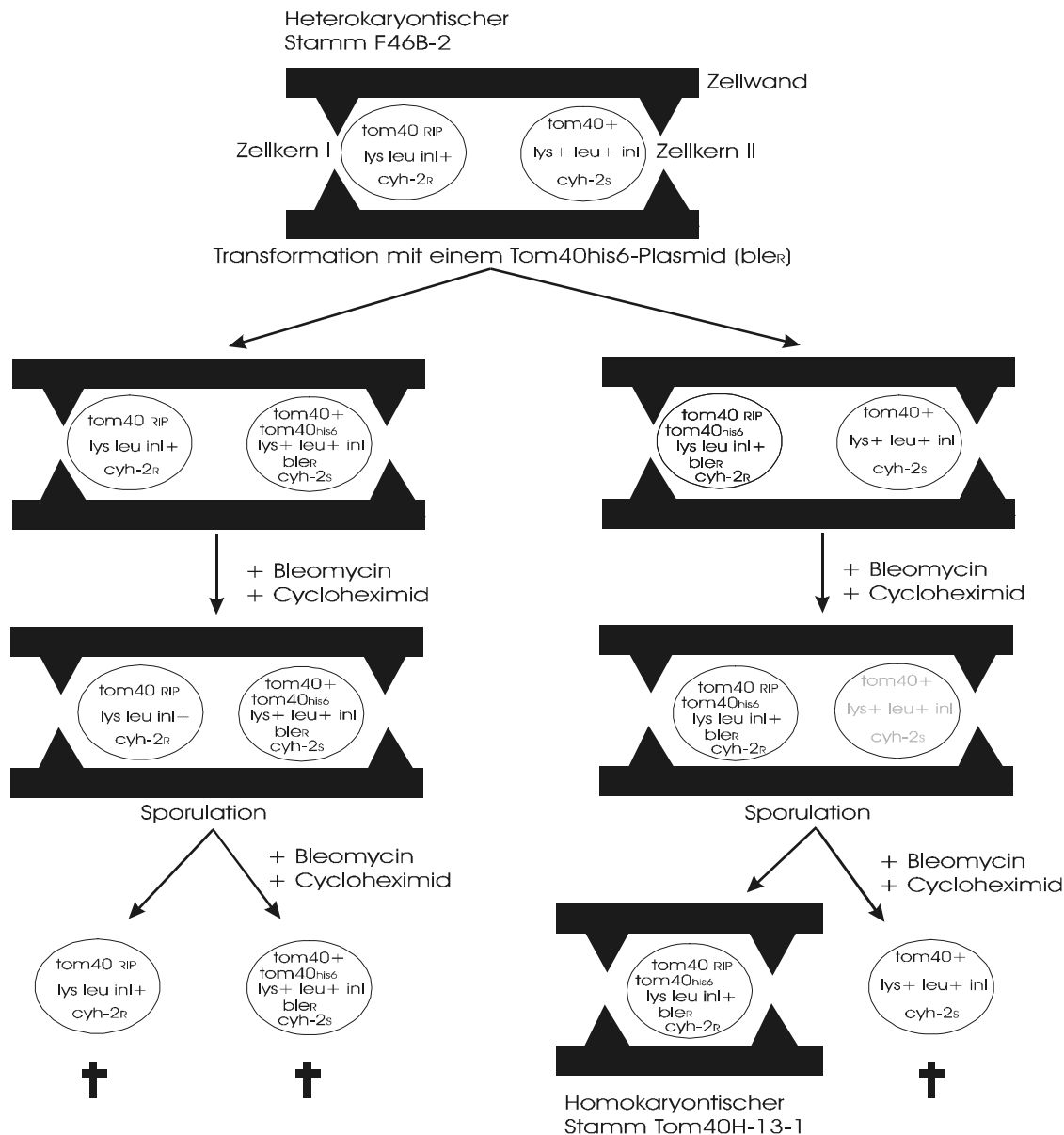


Abbildung 10: Schema der Herstellung des Tom40H-13-1-Stammes

Der *Neurospora crassa*-Stamm, von dem ausgegangen wurde, war der heterokaryontische Stamm F46B-2, der mit dem eine Bleomycin-Resistenz tragenden Tom40_{his6}-Plasmid transformiert wurde. Dann erfolgte Selektion mittels Cycloheximid und Bleomycin auf den homokaryonten Tom40H-13-1 Stamm. Tom40^{RIP}: mittels RIP zerstörtes Tom40-Gen; Tom40⁺: intaktes Tom40-Gen; lys⁺, leu⁺, inl⁺: Fähigkeit zur Lysin-, Leucin- bzw. Inositol-Biosynthese; lys, leu, inl: Genetischer Defekt, der zum Verlust der Fähigkeit zur Lysin-, Leucin- bzw. Inositol-Biosynthese führt; ble_R, cyh_R: Bleomycin-, bzw. Cycloheximid-Resistenz; bles, cyhs: Bleomycin-, bzw. Cycloheximid-Sensitivität.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium: 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 1 % (w/v) Bacto-Trypton
 0,5 % (w/v) NaCl

E. coli-Medien wurden 20 min bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung von Platten wurde 2 % (w/v) Bacto-Agar zugegeben. Zu Selektiv-Medien wurde gegebenenfalls 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte wie von Rose *et al.*, 1990 beschrieben. Das Standard-Medium war YPD.

YPD-Medium: 1 % (w/v) Hefe-Extrakt
 2 % (w/v) Bacto-Pepton
 2 % (w/v) Glucose

Der pH-Wert wurde auf 5,5 eingestellt. Die Kultivierung in flüssigen Medien erfolgte unter Schütteln (120-160 rpm) in Erlenmeyer-Kolben. Zur Herstellung von Platten wurde 2 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Bacto-Agar, Zucker und Medien wurden getrennt autoklaviert.

Für die Isolierung von Mitochondrien wurden die Hefezellen in Lactatmedium kultiviert, das 2 % (w/v) Lactat neben ein wenig Glucose als Kohlenstoffquelle enthielt und das die Bildung von Mitochondrien in den Hefezellen förderte, da diese in diesem Medium zum aeroben Stoffwechsel benötigt sind.

Lactat-Medium: 0,3 % (w/v) Hefe-Extrakt
 0,1 % (w/v) Glucose
 2 % (v/v) Milchsäure
 7,35 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 18,7 mM Ammoniumchlorid
 3,4 mM Calciumchlorid

10,3 mM Natriumchlorid

2,4 mM Magnesiumsulfat

11 μ M Eisen(III)chlorid

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 5,5 eingestellt. Das Medium wurde 20 min bei 120°C autoklaviert.

Als Selektivmedium wurde SD-Lactat-Medium verwendet, ein Minimalmedium, dem steril sterile Substanzen zugemischt werden können, für die der kultivierte Stamm eine Auxotrophie zeigt.

SD-Lactat-Medium: 2 % (v/v) Milchsäure

0,67 % (w/v) Stickstoffbasis aus Hefe (ohne
Aminosäuren)

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 5,5 eingestellt. Das Medium wurde 20 min bei 120°C autoklaviert.

2.2.3 Kultivierung von *Neurospora crassa*

2.2.3.1 Kultivierung in Minimalmedium

10 ml *Neurospora crassa* (Wildtyp 74A) Konidiensuspension (10^8 /ml) wurde steril pro 1 Liter Medium aus 930 ml Wasser, 20 ml 50 x Vogels Minimalmedium (Vogel, 1964) und 40 ml 1,4 M Saccharoselösung (alle Medienkomponenten vorher getrennt autoklaviert) gegeben und 15 Stunden bei 25°C unter Weißlicht und ständiger Luftzufuhr kultiviert.

50 x Vogels Minimalmedium:

150 g $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

250 g KH_2PO_4

100 g NH_4NO_3

10 g MgSO_4

5 g CaCl_2

5 ml Spurenelemente-Lösung

2,5 ml Biotin-Lösung

ad 1 l H_2O

unmarkiertes MgSO_4 zugegeben (aus einer Stammlösung von 20g/l), um das Wachstum der Hyphen zu befördern.

Die Kulturen wurden in 8 l Kolben im Isotopenlabor angezogen. Die aus den Kolben austretende Belüftungsluft wurde durch jeweils zwei hindereinandergeschaltete, mit 1 M NaOH gefüllte Waschflaschen geleitet, um in der Luft befindliches radioaktives Sulfat auszufällen. Die Belüftungsrohre wurden mit Gummibändern flexibel auf den Kolben arretiert, um ein gänztliches Abspringen bei Überdruck zu verhindern. Auch die Ernte des Pilzmycels und die Isolierung der Mitochondrien erfolgte im Isotopenlabor.

2.2.4 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*

Zur Präparation kleiner Mengen von Mitochondrien wurden 10 g Hyphen mit 15 g Quarzsand und 20 ml SEM (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2) mit 1 mM PMSF in einem Mörser zerrieben (ca. 30 sec). Nach Zugabe weiterer 20 ml SEM mit 1 mM PMSF wurden die Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation aus dem Homogenisat abgetrennt. Sie blieben bei den ersten beiden Zentrifugationsschritten im Überstand (je 5 min 3000 x g) und sedimentierten im dritten Durchgang (12 min 17000 x g). Die Mitochondrien wurden mit 20 ml SEM resuspendiert und erneut sedimentiert (12 min 17000 x g), in 1 ml SEM aufgenommen und sofort für Importexperimente eingesetzt. Die Ausbeute betrug etwa 0.3 mg mitochondriales Protein pro Gramm Hyphen (Feuchtgewicht).

Die Gewinnung größerer Mengen an Mitochondrien, wie sie für die Präparation der Außenmembran nötig sind, folgte dem gleichen Protokoll, die Hyphen wurden aber in einer Zelmühle (Sebald *et al.*, 1979) aufgebrochen. 1000-2000 g Hyphen (aus 100 l Kultur) wurden in 3 l SEM mit 1 mM PMSF aufgenommen, mit 1500-3000 g Quarzsand versetzt und 3 mal 10 Sekunden gemixt (Waring Blendor). Der erhaltene Brei wurde 1-2 mal durch eine Zelmühle geschleust. Aus dem Zellhomogenisat wurden die Mitochondrien (ca. 5-10 mg/g Hyphen) durch Zentrifugation wie oben beschrieben abgetrennt. Die letzten beiden Zentrifugationsschritte wurden allerdings jeweils für 50

min durchgeführt (10.000 Upm, Beckmann-JA10-Rotor). Auch wurde vor und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in SM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2) aufgenommen, da EDTA die Bindung von Histidyl-Proteinen an Ni-NTA-Material verhindert.

2.2.5 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte im wesentlichen wie von Daum *et al.*, 1982 beschrieben. Die Anzucht der Zellen (siehe 2.8.2) erfolgte bis zu einer OD₅₇₈ von 1,0 bis 1,5. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4000 Upm, Beckman-JA10-Rotor) geerntet und mit H₂O gewaschen. Das Sediment wurde gewogen und in 2 ml/g 100 mM Tris/SO₄ pH 9,4, 10 mM DTT resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, abermals zentrifugiert und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM KPi pH 7,4 gewaschen.

Um die Zellen in Sphäroplasten umzuwandeln, wurden sie in 7 ml/g 1,2 M Sorbitol, 20 mM KPi pH 7,4 mit 3 mg/g Zymolyase resuspendiert und für 30-45 min bei 30°C (bzw. 45-60 min bei 25°C) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Effizienz der Zymolyase-Behandlung wurde überprüft, indem 20 µl Zellsuspension in 1 ml H₂O gegeben und kurz geschüttelt wurden; die Zymolyase-Behandlung war ausreichend, sobald die Suspension nach einigen Sekunden klar wurde. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, 2°C, Beckman-JA10-Rotor) gesammelt und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM KPi pH 7,4 gewaschen.

Um die Sphäroplasten aufzubrechen, wurden sie in 3 ml/g 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 1 mM PMSF resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet (10-15 Stöße, Glasstempel). Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (4000 Upm, 5 min, 2°C, Beckman-JA20-Rotor) und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Das Sediment wurde wie oben beschrieben erneut homogenisiert und zentrifugiert, und beide Überstände wurden vereinigt. Die darin enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12.000 Upm, 12 min, 2°C, Beck-

man-JA20-Rotor) gesammelt und vorsichtig in 0,25-1 ml 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4 resuspendiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Mitochondrien wurden mit 10 mg/ml fettsäurefreiem BSA in 20 µl Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Isolierung der mitochondrialen Außenmembran von *Neurospora crassa*

Isolierte Mitochondrien von *Neurospora crassa* wurden bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in einem hypotonen Schwellpuffer aus 5 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 1 mM EDTA und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Mitochondrienmembranen wurden durch Zentrifugation bei 17.700 x g reisoliert und erneut in Schwellpuffer resuspendiert. In einem automatischen Glass-Teflon-Homogenisator wurden während 40 min bei 0°C Teile der Außenmembran von den Mitoplasten abgeschert. 20 ml Homogenat wurden auf einen Stufengradienten aufgetragen (10 ml 0,9 M Saccharose und 9 ml 0,25 M Saccharose in jeweils EMP, das sind 1 mM EDTA, 10 mM MOPS pH 7,0 und 1 mM PMSF) und für eine Stunde bei 141.000 x g in einem Beckmann SW28 Rotor zentrifugiert. Während intakte Mitochondrien, Mitoplasten und Bruchstücke der Innenmembran sedimentierten, sammelte sich die mitochondriale Außenmembran zusammen mit der sogenannten "intermediate density fraction", einer Mischung aus Außen- und Innenmembran, an der Grenzschicht zwischen 0,25 M und 0,9 M Saccharose. Diese Schicht wurde mit einer Pipette abgesaugt und durch Zugabe von 2 M Saccharose auf 0,9 M Saccharose eingestellt. Jeweils 15 ml der Probe wurden mit 21 ml 0,72 M Saccharose in EMP und mit 3 ml EMP (0 M Saccharose) Puffer überschichtet und 10 Stunden bei 141.000 x g durch den Saccharosedichtegradienten flotiert. In diesem Schritt sammelt sich die Außenmembran aufgrund ihrer geringen Dichte an der Grenzschicht zwischen 0,72 M Saccharose und 0 M Saccharose an. Verunreinigungen wie die Innenmembran oder das Endoplasmatische Retikulum bleiben dagegen in der Schicht zwischen 0,72 M und 0,9 M Saccharose zurück. Die

Außenmembran wurde wiederum mit einer Pipette aus dem Gradienten entnommen und mit 10 mM KAc Puffer (pH 7,0) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 141.000 x g im Ti70 Rotor (30 min) wurden die Außenmembranen pelletiert, in 3 bis 5 ml 10 mM KAc Puffer aufgenommen und einer Proteinbestimmung unterzogen. Die isolierten Außenmembranvesikel konnten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Isolierung des TOM-Holo-Komplexes aus Außenmembranvesikeln

Zur Isolierung des TOM-Holo-Komplexes wurden Außenmembranvesikel aus dem *Neurospora crassa*-Stamm GR107 mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glycerin, 1,25 % Digitonin, 1 mM PMSF) gelöst. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln ("Rock'n Roller") wurde ungelöstes Material durch Zentrifugation bei 226.200 x g (30 min) im Beckmann Ti50 Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde bei 60 min Ladezeit und einer Flußrate von 1 ml/min mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf eine Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Säule geladen. Dabei wurde für jeweils 10 mg Außenmembranvesikel 1 ml Ni-NTA Säulenmaterial (Quiagen) eingesetzt. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Solubilisierungspuffer mit normalem Digitoningehalt (1,25 %) und anschließend mit 20 Säulenvolumen Solubilisierungspuffer mit auf 0,5 % reduziertem Digitoningehalt gewaschen. Die Entfernung unspezifisch an die Säule gebundenen Materials erfolgte durch einen Konzentrationsgradienten von 0 mM bis 60 mM Imidazol über 10 Säulenvolumen, gefolgt von einer Stufe von 60 mM Imidazol mit einem Säulenvolumen. Zur Elution des spezifisch gebundenen TOM-Komplexes wurde Solubilisierungspuffer mit 0,5 % Digitonin und 300 mM Imidazol verwendet. Die Effizienz der Reinigung wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford und der Reinheit durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau überprüft.

2.3.2 Herstellung von TOM-Core-Komplex aus gereinigtem TOM-Gesamtkomplex

100 µl TOM-Holo-Komplex (1 mg/ml) in 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin und 0,5 % Digitonin wurden mit 1 % DDM mit Hilfe einer 10 % DDM-Stammlösung versetzt. Der Versuchsansatz wurde für 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln ("Rock'n Roller") inkubiert, danach auf eine mit 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 0,1 % DDM, 1 mM PMSF vorequilibrierte Gelfiltrationssäule TSK G4000PW_{XL} (Toso-Haas) aufgetragen und bei konstanter Flußrate von 0,45 ml/min eluiert. Dabei wurde der TOM-Core-Komplex von den abdissoziierten Komponenten getrennt.

2.3.3 Isolierung des TOM-Core-Komplexes aus Mitochondrien

Zur Isolierung großer Mengen TOM-Core-Komplexes aus Mitochondrien wurde grundsätzlich von 5 g isolierten *Neurospora crassa*-Mitochondrien ausgegangen. Bei der Isolierung der Mitochondrien (siehe oben) wurde der letzte Waschschritt mit Puffer ohne EDTA durchgeführt, weil EDTA die Bindung von Histidin-erweiterten Proteinen an Ni-NTA behindert.

Diese Mitochondrien wurden mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 1,0 % DDM, 1 mM PMSF) gelöst. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter leichtem Rühren wurde ungelöstes Material durch Zentrifugation bei 226.200 x g (30 min) im Beckmann Ti70 Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde bei einer Flußrate von 3 ml/min mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Gilson) auf eine Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Säule (Durchmesser von 5 cm) geladen. Für 5 g Mitochondrien wurden 25 ml regeneriertes Ni-NTA Säulenmaterial (Quiagen) eingesetzt (zur Regenerierung des Säulenmaterials siehe unten). Die Säule war vorher mit 1,5 Säulenvolumina Solubilisierungspuffer vorequibriert worden. Nach dem Beladen wurde die Säule mit 8 Säulenvolumen DDM-Waschpuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 0,1 % DDM, 30 mM Imidazol, 1 mM PMSF) bei

gleicher Flußrate gewaschen. Schließlich wurde das gebundene Material mit 50 ml DDM-Elutionspuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glycerin, 0,1 % DDM, 300 mM Imidazol, 1 mM PMSF) bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert.

Als zweiter Reinigungsschritt und zur Aufkonzentration des TOM-Kernkomplexes wurde eine Anionenaustauschchromatographie in einem ÄKTA-Purifier (Amersham-Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurde das Eluat der Ni-NTA-Säule mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine 6 ml-ResourceQ-Säule (Pharmacia Biotech) aufgetragen. Diese Säule war zuvor mit zwei Säulenvolumina Resource-Puffer A (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glycerin, 0,1 % DDM, 1 mM PMSF), zwei Säulenvolumina Resource-Puffer B (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glycerin, 0,1 % DDM, 1 M Kaliumchlorid, 1 mM PMSF) und fünf Säulenvolumina Resource-Puffer A equilibriert worden. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0-50 % Resource-Puffer B über 15 ml bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Es wurden Fraktionen á 0,5 ml gesammelt. Der TOM-Core-Komplex eluierte immer bei einer Leitfähigkeit um 12 mS und einem Salzgehalt von ca. 250 mM KCl. Die Effizienz der Reinigung wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford und der Reinheit durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau überprüft.

2.3.4 Isolierung von Tom40 aus Außenmembranvesikeln

Zur Isolierung von Tom40_{his6} wurden Außenmembranvesikel der *Neurospora crassa*-Stämme U3-2-III oder T40H-13-1 bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 20 % Glycerin 0,5 % Triton X-100, 200 mM KCl, 1 mM PMSF) gelöst. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln ("Rock'n Roller") wurde ungelöstes Material durch Zentrifugation bei 226.200 x g (30 min) im Beckmann Ti50 Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde bei 60 min Ladezeit und einer Flußrate von 1 ml/min mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf eine Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Säule geladen. Dabei wurde für

jeweils 10 mg Außenmembranvesikel 1 ml Ni-NTA Säulenmaterial (Quiagen) eingesetzt. Die Säule wurde mit mit 20 Säulenvolumen Solubilisierungspuffer gewaschen. Die Entfernung unspezifisch an die Säule gebundenen Materials erfolgte durch einen Konzentrationsgradienten von 0 mM bis 30 mM Imidazol über 10 Säulenvolumen, gefolgt von einer Stufe von 30 mM Imidazol mit einem Säulenvolumen. Zur Elution des spezifisch gebundenen TOM-Komplexes wurde Solubilisierungspuffer mit 300 mM Imidazol verwendet. Die Effizienz der Reinigung wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford und der Reinheit durch SDS-PAGE und Silber-Färbung überprüft.

2.3.5 Isolierung von TOM-Core-Komplex und von Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.5.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

500 µl einer Hefekultur (OD₅₇₈ ca. 1) wurden 3 min bei 13 000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 0,5 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Nun wurden die Zellen in 0,5 ml H₂O resuspendiert und mit 75 µl Aufschlußpuffer (2 M NaOH; 2 mM PMSF; 7 % (v/v) β-Mercaptoethanol) gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 575 µl 50 % (w/v) TCA (4°C) zur Neutralisation zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, mindestens 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 30.000 x g, 2°C). Der resultierende Proteinniederschlag wurde zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 20 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.3.5.2 Isolierung von TOM-Core-Komplex aus Hefemitochondrien

100 µg Mitochondrien des Hefestammes UA-TH-32 wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Kaliumacetat

pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 1,0 % DDM, 1 mM PMSF) gelöst. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln ("Rock'n Roller") wurde ungelöstes Material durch Zentrifugation bei 226.200 x g (20 min) im Beckmann TLA45-Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde mit 20 µl in Solubilisierungspuffer equilibriertem Ni-NTA-Material versetzt und 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln ("Rock'n Roller") inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand durch SDS-PAGE und Immunodekoration nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose oder Coomassiefärbung des Gels auf nichtgebundenes Protein untersucht. Das Ni-NTA Material wurde 3 x in 100 µl DDM-Waschpuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 0,1 % DDM, 30 mM Imidazol, 1 mM PMSF) gewaschen. Anschließend wurde das Ni-NTA Material mit 100 µl DDM-Elutionspuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 0,1 % DDM, 300 mM Imidazol, 1 mM PMSF) für 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln ("Rock'n Roller") inkubiert. Der Überstand dieser Prozedur wurde durch SDS-PAGE und Immunodekoration nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose oder Coomassiefärbung des Gels auf gebundenes Protein - d.i. TOM-Core-Komplex - untersucht.

2.3.5.3 Isolierung von Tom40 aus Hefemitochondrien

Sollte nur Tom40_{his6} aus Hefemitochondrien isoliert werden, dann wurde eine zu 2.2.7.2 analoge Prozedur angewandt, bei der sämtliche Puffer zusätzlich 7 M Harnstoff enthielten. Es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

2.3.6 Zerlegung des TOM-Core-Komplexes und Reinigung von Tom40 von *Neurospora crassa*

Gereinigter TOM-Core-Komplex wurde an eine mit Resource-Puffer A vorequilibrierte Ni-NTA-Säule (2 ml) bei einer Flußrate von 0,1 ml/min gebunden. Nach Waschen mit Resource-Puffer A wurde der Komplex durch 10 ml Zerlegungspuffer A (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 %

Glyzerin, 3 % Octylglycosid) bei einer Flußrate von 0,033 ml/min zerlegt. In die gesammelten Fraktionen á 1 ml wurde jeweils 50 µl 10 % DDM vorgelegt (Endkonzentration also 0,5 %).

Die Fraktionen wurden zur Stabilisierung von Tom40 sofort in einem ÄKTA-Purifier auf eine mit Resource-Puffer C (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 0,5 % DDM) vorequilibrierte 1ml-ResourceQ-Säule bei einer Flußrate von 0,25 ml/min aufgetragen. Nach Auftrag sämtlicher Fraktionen wurde der isolierte und gereinigte Tom40-Komplex mittels eines Gradienten von 0-100 % Resource-Puffer D (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 0,5 % DDM, 1 M KCl) eluiert und bei 4°C aufbewahrt.

Die Stabilisierung von Tom40 durch Detergensaustausch konnte auch durch einen Saccharosedichtegradientenlauf in 0,5 % DDM erreicht werden. Der Saccharosedichtegradient bestand aus Stufen von 35, 27, 19, 15, 11 und 7 % SEM (Prozent an Saccharose), supplementiert mit jeweils 0,5 % DDM. Zentrifugiert wurde über Nacht bei 141.000 x g im SW60-Rotor. Das Tom40-Protein fand sich zwischen 11-19 % SEM wieder.

Der an die Ni-NTA-Säule gebundene Rest-Komplex wurde mit 10 ml Zerlegungspuffer B (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 1 % Octylglycosid; 30 mM Imidazol) bei einer Flußrate von 0,16 ml/min gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des Rest-Komplexes mit 5 ml Zerlegungspuffer C (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 1 % Octylglycosid; 300 mM Imidazol). Das Tom22 in den dabei gesammelten Fraktionen á 1 ml wurde ganz analog zum Tom40 mit Hilfe eines Anionenaustauscherchromatographieschritts stabilisiert.

2.3.7 Isolierung von Porin aus Außenmembranvesikeln

Die Isolierung von Porin wurde in Anlehnung an Freitag *et al.*, 1982 und Freitag *et al.*, 1983 durchgeführt. Dazu wurden Außenmembranvesikel von *Neurospora crassa* mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml in Solubilisierungspuffer (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 20 % Glyzerin, 1 % DDM, 1 mM PMSF) gelöst. Nach 30 min Inkubation bei 4°C unter leichtem

Schütteln (“Rock’n Roller”) wurde ungelöstes Material durch Zentrifugation bei $226.200 \times g$ (30 min) im Beckmann Ti50 Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde in einem ÄKTA-Purifier bei einer Flußrate von 0,5 ml/min über eine ResourceQ (1ml)-Säule gepumpt. Dabei blieb das gereinigte Porin im Durchlauf, während alle anderen Proteine weitgehend an das Säulenmaterial gebunden wurden. Viele Lipide aus den Außenmembranvesikel fanden sich allerdings zusammen mit dem gereinigten Porin im Durchlauf.

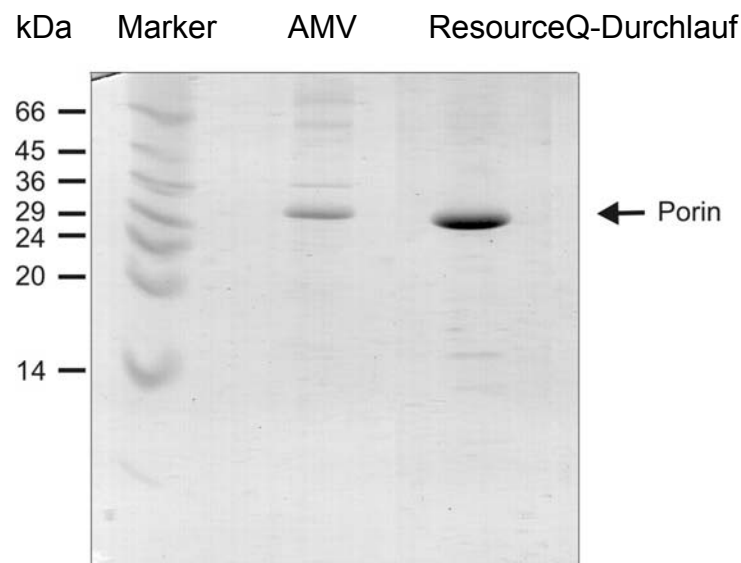


Abbildung 11: Aufreinigung von mitochondrialem Porin

Coomassie-gefärbtes High-Tris-Harnstoffgel einer Aufreinigung mitochondrialen Porins aus dem *Neurospora crassa*-Stamm GR107. Die linke Spur enthält Markerproteine mit der indizierten Molekülmasse, die zweite Spur Außenmembranvesikel, die dritte den Durchlauf der ResourceQ-Ionenaustauschersäule. Die Porin-Bande ist am Rande bezeichnet. Es sind jeweils 150 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Für eine typische Isolierung von Porin dienten Außenmembranvesikel (30 mg Protein) des *Neurospora crassa*-Stammes GR107 als Ausgangsmaterial. Daraus wurden ca. 2,5 mg Porin in weitgehend reiner Form isoliert (Abb.11). Das so gewonnene Material wurde für Kontrollmessungen von CD- und FTIR-Spektren, sowie bei Leitfähigkeitsmessungen eingesetzt.

2.3.8 Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Zur chemischen Quervernetzung mitochondrialer Proteine in ganzen Mitochondrien, in Außenmembranvesikel und in isoliertem Zustand wurden die

Quervernetzungsreagenzien DSG (Disuccinimidylglutarat; Pierce) und BS³ (Bis- Sulfosuccinimidylsuberat; Pierce) mit einer Konzentration von 8 mg/ml in DMSO (Dimethylsulfoxyd) gelöst. EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimide; Pierce) wurde mit einer Konzentration von 8 mg/ml, Glutardialdehyd (Sigma) mit einer Konzentration von 1 % (v/v) und Formaldehyd mit einer Konzentration von 37 % in H₂O gelöst. Zu 80 µg Mitochondrien oder Außenmembranvesikeln (Konzentration von 1 mg/ml) oder isoliertem TOM-Komplex bzw. Tom40 (Konzentration zwischen 0,2 und 0,5 mg/ml) wurden die Quervernetzungsreagenzien in Konzentrationen von 0-500 µM (DSG, BS³), 0-200 µM (EDC) und 0-300 µM (Glutardialdehyd, Formaldehyd) hinzugegeben. Als Reaktionspuffer diente 50 mM Kaliumacetat, 10 % Glycerin, 0,1 % DDM, pH 7,0. Nach einer Inkubation von 30 min bei 0°C wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 1 M Glycin, pH 8,0 zu einer Endkonzentration von 0,1 M beendet. Die Mitochondrien wurden reisoliert, in SEM gewaschen und schließlich TCA-gefällt und in Probenauftragspuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen.

2.3.9 Trypsinisierung des TOM-Core-Komplexes

300 µg gereinigter TOM-Core-Komplex von *Neurospora crassa* wurden für 15 min mit 100 µg/ml Trypsin in 100 µl 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glycerin und 0,1 % DDM auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der proteolytische Verdau mit 1 mM PMSF und 200 µg/ml Trypsininhibitor (Sigma) gestoppt. Der Restkomplex wurde auf eine mit Elutionspuffer vorequilibrierte TSK G4000PW_{XL}-Gelfiltrationssäule aufgetragen und Trypsin und Trypsininhibitor abgetrennt. Mittels Immunoblotting wurde kontrolliert, daß kein Tom6, Tom7 und Tom22 nativer Größe mehr im trypsinisierten Komplex vorhanden war.

2.3.10 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

2.3.10.1 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurden aus *E. coli* gereinigte Plasmide der pGEM-Reihe verwendet, die die kodierende Sequenz für das entsprechende Vorstufenprotein unter der Kontrolle des SP6-Promotors enthielten. Ein Transkriptionsansatz setzte sich zusammen aus: 120 µl Prämix (40 mM HEPES/KOH pH 7.4, 6 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, 100 µM GTP, je 500 µM ATP, CTP, UTP), 250 µM ^{m7}G(5')ppp(5')XG, 10-20 µg DNA, 200 U RNasin, 40 U SP6-Polymerase und H₂O zu einem Endvolumen von 200 µl. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde nach Zugabe von 20 µl 10 M LiCl und 600 µl Ethanol für 30 min bei -80°C gefällt. Nach Isolierung der RNA durch Zentrifugation bei 20 000 x g in einem Beckman-JA18-Rotor wurde die RNA für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O, 1 µl RNasin resuspendiert.

2.3.10.2 *In vitro* Translation

Ein Standard-Translationsansatz setzte sich zusammen aus: 140 µl Kaninchen-Retikulozytenlysats (Promega), 4 µl RNasin, 4 µl Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 1 mM), 16 µl ³⁵S-Methionin (10 mCi/ml) und 16 µl RNA. Der Ansatz wurde für 1 h bei 30°C inkubiert. Der Einbau radioaktiven Methionins wurde anschließend durch Zugabe von 5 mM nicht radioaktivem Methionin gestoppt. Um für *in vitro*-Importreaktionen isotonische Bedingungen herzustellen, wurde Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 250 mM zugesetzt. Der Ansatz wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der synthetisierten Vorstufenproteine wurde das Lysat durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie untersucht.

2.3.11 Import *in vitro* synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien

Für einen Standard-Import-Ansatz wurden 50 µg Mitochondrien in 100 µl Import-Puffer (3 % (w/v) fettsäurefreies BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM MnCl₂, 2 mM KPi, 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2) gegeben und mit 5 mM NADH und 2,5 mM ATP versetzt. Dann wurde abhängig vom Vorstufenprotein 0,2-10 µl in Retikulozytenlysat translatiertes Protein zugegeben und bei 25°C importiert. Der Import wurde durch Zugabe von 0,5 µM Valinomycin beendet. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (10 min, 10 000 x g, 2°C) isoliert und in SEM gewaschen. Anschließend wurden die Proteine in Laemmli-Puffer gelöst und durch SDS-PAGE analysiert.

2.3.12 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*-Einschlußkörperchen

Die in der vorliegenden Arbeit aus *E. coli* isolierten rekombinanten Proteine Su9-DHFR und Tom40 mit einer Hexahistidyl-erweiterung wurden von den *E. coli*-Zellen nur in unlöslicher Form exprimiert und als Einschlußkörperchen (sog. Inclusion bodies) eingelagert. Die Einschlußkörperchen wurden während des Zellaufschlusses in Harnstoff gelöst und daraus anschließend die Proteine isoliert.

Eine 1 l *E. coli* Kultur des entsprechenden Stammes wurde in LB-Amp bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,8 angezogen; anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins für 2-5 h durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Die Induktionszeit mußte so gewählt werden, daß optimale Expression bei minimalem Abbau gegeben waren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 4000 rpm, Beckman-JA10-Rotor), in 25 ml Puffer A (30 mM Tris/HCl pH 7,0, 7 M Harnstoff, 10 mM Imidazol, Proteinaseinhibitoren Complete-EDTAfree (Roche)) mit 0,5 % Triton X-100 resuspendiert und durch Beschallung im Branson Sonifier 250 (Mikrospitze, Stufe 3, 50 % Duty Cycle, 10 Impulse von je 10 sec, durch 5 sec Intervalle unterbrochen) und anschließendes Einfrieren (-20°C) und Auftauen aufgeschlossen. Das Zell-Lysat wurde zentrifugiert (15 min, 12.000 rpm,

Beckman-JA20-Rotor), und das rekombinante Protein im Überstand wurde anschließend mit Hilfe einer Pristaltik-Pumpe bei 4°C an eine 5 ml Ni-NTA-Agarose-Säule (äquibriert mit Puffer A mit 0,5 % Triton X-100) gebunden. Anschließend wurde die Säule in eine FPLC-Anlage montiert, mit 50 ml Puffer A gewaschen und mit einem Gradienten von 10-300 mM Imidazol eluiert. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Je 10 µl der gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und bei -20°C gelagert.

2.3.13 Bindungsstudien von mitochondrialen Präproteinen an Außenmembranvesikel und isolierten TOM-Komplex

Für Bindungsstudien von mitochondrialen Präproteinen wurden folgende Substrate eingesetzt: Su9(1-69)-DHFR_{His6} (rekombinant exprimiertes Su9(1-69)-DHFR, siehe 2.3.12); DHFR_{His6} (dito) und reduziertes carboxymethyliertes Laktalbumin (RCLMA; Sigma).

Das Protein wurde in einem Volumen von 100 µl entweder mit gereinigten TOM-Holo-Komplex, gereinigten TOM-Core-Komplex oder Außenmembranvesikel inkubiert. Die Menge der einen Komponente wurde bei Konstanthaltung der anderen variiert. Grundsätzlich wurde zur Bindung jeweils in 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glycerin und 0,1 % DDM oder entsprechend 0,5 % Digitonin für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert – im Falle von Außenmembranvesikeln ohne Detergens. Danach wurden die Proteine der Probe über eine mit Elutionspuffer vorequilibrierte TSK G4000PW_{XL}-Gelfiltrationssäule aufgetrennt – im Falle von Außenmembranvesikeln vorher solubilisiert in 1 % DDM. Oder die Proteine der Probe wurden in einem Saccharosedichtegradientenlauf mit den Stufen 35, 27, 19, 15, 11 und 7 % SEM-Puffer (jeweils % Saccharose; 2,5 mM EDTA; MOPS/KOH, pH 7,2) supplementiert mit Detergens aufgetrennt - über Nacht bei 32.000 Upm (SW60-Rotor, Beckmann).

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.1.1 Bestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem von Bradford, 1976 beschriebenen Verfahren mit dem "BioRad-Proteinassay". Die Proben wurden mit einer 1:5-Verdünnung des Farbstoff-Konzentrates gemischt. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter ImmunglobulinG-Konzentration (Standard von BioRad).

2.4.1.2 Bestimmung nach der Biuret-Methode

Bei der Biuret-Methode handelt es sich um eine allgemeine Nachweisreaktion für Säureamid (z.B. Proteine und deren Abbaustufen, Diamide, synthetische Polypeptide, Histidin, Urobilin, Porphobilinogen). Der durch Kalilauge alkalisch gemachten Proben-Lösung wird eine wässrige Lösung von kristallinem Kupfersulfat mit Kaliumnatriumtartrat und Ätznatron zugesetzt, die mit den genannten Substanzen eine komplexe Kupferverbindung bildet, aus der bei Anwesenheit von Albuminen eine blauviolette, bei Peptonen eine rosarote Verfärbung der wässrigen Probe resultiert. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers Pierce ("BCA Protein Assay Kit"), wobei die Proben in der Regel 30 min bei 60°C zusammen mit den Reagenzien inkubiert wurden. Die Absorption wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Durch Vergleich der Absorption mit einer aus bekannten Proteinkonzentrationen (ImmunglobulinG von BioRad) erstellten Eichgeraden ergibt sich die zu ermittelnde Proteinkonzentration.

2.4.1.3 Bestimmung mittels Absorption im Ultraviolett-Bereich

Licht im Ultraviolettbereich absorbieren von den Aminosäuren vorzugsweise die Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin ($\epsilon_{274} = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Tryptophan ($\epsilon_{280} = 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Phenylalanin ($\epsilon_{250} = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Für eine Abschätzung der Proteinkonzentration kann eine Absorptionsmessung einer Proteinlösung bei 280 nm genommen werden, wobei eine Absorption von 1,0 AU (aus dem Englischen: absorption unit) etwa einer Konzentration von 1 mg/ml entspricht.

Aus der Absorption einer Lösung harnstoffdenaturierten Proteins und der Kenntnis der genauen Anzahl der darin enthaltenen Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninreste lässt sich die genaue Konzentration des Proteins in dieser Lösung bestimmen. Für genaue Konzentrationsbestimmungen von isoliertem Tom40 und mitochondrialem Porin wurden die Proben mit festem Harnstoff bis zu einer Konzentration von 7 M versetzt. Unter Berücksichtigung der Volumenzunahme durch die Harnstoffzugabe und der oben gegebenen molaren Extinktion für Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin wurde die Konzentration der Probe gemäß Lambert-Beer'schem Gesetz anhand der Absorption bei 280 nm berechnet. Da die Absorptionen der Aminoacylreste pH-abhängig ist, wurden die Messungen bei pH 7,0 durchgeführt.

2.4.2 Fällung von Proteinen

2.4.2.1 Fällung mit Trichloressigsäure

Proteine wurden aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 1/5 Volumen 72 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Nach kurzzeitigem Einfrieren der Probe bei -20°C wurden die Proben für 60 min bei $30.000 \times g$ abzentrifugiert, einmal mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, 10 min bei 56°C getrocknet und in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

Bei Proben mit geringer Proteinkonzentration unter $10 \mu\text{g/ml}$ funktioniert die TCA-Fällung oft nicht. Aus diesem Grunde wurde vor der Fällung ein

Protein – beispielweise BSA – zu diesen Proben hinzugegeben, so daß die Gesamtproteinkonzentration über 10 µg/ml lag.

2.4.2.2 Fällung mit Aceton

Zur Proteinfällung wässriger Proteinlösungen wurde Aceton im Verhältnis 1:9 (v:v) zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 30.000 x g zentrifugiert, der Niederschlag getrocknet und in Probenpuffer aufgenommen.

Die Acetonfällung hat den Vorteil, daß der Proteinniederschlag nach dem Fällen nicht mehr gewaschen werden muß. Allerdings hat sie den Nachteil, daß sie für größere Probenvolumina unpraktisch wird und bestimmte Detergentien – wie beispielsweise Triton X-100 – zu unerwünschten Niederschlägen führen.

2.4.3 Aufkonzentrierung von Proteinenlösungen

Zur Aufkonzentration von Proteinlösungen wurde die Probe in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) zentrifugiert (5000 Upm, 2°C, Beckman-JA20-Rotor). Je nach Größe der Zelle (10 ml, 50 ml) und der Porengröße der verwendeten Filter (10 kDa, 30 kDa, 100 kDa Ausschlußgröße) konnten verschiedene Volumina und Lösungen unterschiedlicher Proteinzusammensetzung eingeengt werden. Detergentien konnten – in Abhängigkeit von ihrer Mizellengröße – nur mehr oder weniger gut durch die Membran filtriert werden, so daß zusammen mit dem Protein auch meist das Detergens aufkonzentriert wurde. Detergens-haltige Proteinlösungen, die gereinigten TOM-Komplex oder isoliertes Tom40 enthielten, wurden daher mittels Anionenaustauschchromatographie (ResourceQ; Pharmacia Biotech) aufkonzentriert.

2.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.4.4.1 Standard-SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 aufgetrennt. Sammel-, Trenn- und Bodengel hatten eine Größe von 10 x 150 x 1 bzw. 90 x 150 x 1 bzw. 5 x 150 x 1 mm. Die Gel-Lösungen hatten folgende Zusammensetzung: Sammelgel: 5 % Acrylamid, 0,033 % Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,1 % TEMED; Trenngel: 16 % Acrylamid, 0,1 % Bisacrylamid, 385 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,035 % TEMED; Bodengel: 30 % Acrylamid, 0,1 % Bisacrylamid, 385 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,08 % TEMED. Die Proben wurden in 1x Probenpuffer (2 % SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8) gelöst und vor dem Auftrag für 3 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstant 30 mA; der Laufpuffer enthielt 10 g/l SDS, 144 g/l Glycin, 30 g/l Tris. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose übertragen (siehe 2.4.5) oder mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 oder Silber angefärbt (siehe 2.4.8).

2.4.4.2 High-Tris-Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung kleinerer Proteine (ab 2 kDa) wurde ein Polyacrylamidgel mit höherem Vernetzungsgrad, Harnstoff im Gelpuffer sowie ein veränderter Laufpuffer verwendet. Das Trenngel hatte eine Zusammensetzung von 19 % Acrylamid, 0,25 % Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,75 M Tris/HCl (pH 8,8) und 0,1 % SDS. Das Sammelgel setzte sich aus 5 % Acrylamid, 0,07 % Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8) und 0,1 % SDS zusammen. Die Gele waren 25 cm lang bei einer Stärke von 1 mm. Der Laufpuffer bestand aus 200 mM Glycin, 50 mM Tris und 0,1 % SDS (pH Wert ergibt sich aus den Komponenten).

2.4.4.3 Blaue Nativgelelektrophorese

Für die Analyse ganzer Proteinkomplexe wurde die blaue Nativgelelektrophorese (Schagger and von Jagow, 1991) eingesetzt. In Digitonin solubilisierete Membranproteine aus Mitochondrien oder mitochondrialen Außenmembranen sowie isolierte Membranproteine in Detergens-haltigem Puffer wurden im Verhältnis 10:1 (v/v) mit Probenpuffer (5 % Serva-Blau XG, 500 mM 6-Aminocapronsäure) versetzt und auf ein Nativgel aufgetragen. Dessen Trenngel bestand aus 5-10 % Acrylamid in einem linearen Gradienten, 0,15-0,3 % Bisacrylamid und 0-16 % Glycerin, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,04 % APS und 0,04 % TEMED. Für das Sammelgel wurden 3,8 % Acrylamid, 0,12 % Bisacrylamid, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,08 % APS und 0,08 % TEMED verwendet. Zum Abschluß des Gels wurde ein Bodengel mit 20 % Acrylamid, 0,13 % Bisacrylamid, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,05 % APS und 0,025 % TEMED gegossen. Der Kathodenpuffer A bestand aus 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, 0,02 % Serva Blau XG (pH 7,0). Der Kathodenpuffer B hatte die gleiche Zusammensetzung, allerdings ohne Farbstoff. Als Anodenpuffer wurde eine 50 mM Bistris/HCl-Lösung (pH 7,0) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde zuerst bei 100 V gestartet und nach dem Einlaufen der Proben in das Gel bei 500 V fortgesetzt. Die Stromstärke war auf 15 mA limitiert. Sobald die blaue Laufront des Kathodenpuffers A ca. ein Drittel weit in das Gel eingelaufen war, wurde ein Pufferwechsel von Kathodenpuffer A zu Kathodenpuffer B vorgenommen, während der Anodenpuffer nicht ausgetauscht wurde. Danach wurde die Elektrophorese bei 500 V fortgesetzt.

2.4.4.4 Alkalische Nativgelelektrophorese

Um Proteine in ihrer nativen Form aufzutrennen wurde alternativ ein kommerzielles „Native-PAGE“-System (PhastSystem; Pharmacia) verwendet. Es wurden Gradientengele mit 4-15 % Vernetzungsgrad des Polyacrylamids (Pharmacia) eingesetzt. Die Proben wurden nach Vorschrift des Herstellers

vorbereitet. Aufgetragen wurden jeweils zwischen 0,1 und 2 µg in 1 µl auf einen Steg eines 8/1er Auftragkammes (Pharmacia). Eine Spur wurde mit 0,5 % Coomassie-G250 beladen. Der Laufpuffer enthielt 0,88 M L-Alanin und 0,25 M Tris bei pH 8,8. Die Auftrennung erfolgte bei 15°C nach dem Standardprogramm: Für 10 Vh bei Limitierung auf 400 V, 10 mA und 2,5 W; für 2 Vh bei Limitierung auf 400 V, 1 mA und 2,5 W; anschließend für 268 Vh bei Limitierung auf 400 V, 10 mA und 2,5 W. Die Gele wurden anschließend Coomassie-gefärbt (PhastSystem-Vorschrift „No.200 Fast coomassie staining“) oder nach Abtrennung des Gels von der Trägerunterlage, wie unter 2.3.6 beschrieben, geblottet.

2.4.5 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen (“Western Blotting”)

2.4.5.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt worden waren und mit spezifischen Antikörpern dekoriert werden sollten, wurden nach der von Towbin *et al.*, 1979 und Kyhse Andersen, 1984 beschriebenen Methode elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schnell) übertragen. Die Membran und das Gel wurden zwischen mehrere mit Blotpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) SDS) getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und zwischen zwei Graphitelektroden geklemmt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 1 mA/cm². Zur Überprüfung des Transfers auf die Nitrocellulose wurden die Proteine durch Behandlung mit 0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA angefärbt.

2.4.5.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Transfer von Proteinen auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Immobilon) folgte im wesentlichen dem Protokoll für den Transfer auf Nitrocellulosemembranen. PVDF-Membranen wurden allerdings zuvor in Methanol benetzt, in eine Blotschale auf die Oberfläche des Blotpuffers

gelegt und abgewartet, bis der Blotpuffer das Methanol aus der Membran verdrängt hatte. Erkennbar war dies am Einsinken der Membran in die Blotflüssigkeit. Sollten die transferierten Proteine anschließend sequenziert werden, wurde statt Glycin 10 mM CAPS, pH 11,0 als Puffersubstanz bei der Herstellung des Blotpuffers eingesetzt.

2.4.6 Autoradiographie, Fluorographie und Densitometrie von Polyacrylamidgelen

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Autoradiographie, Fluorographie oder sogenanntes „Phosphorimaging“ sichtbar gemacht.

Für die Fluorographie wurde das entfärbte Gel für 10 min in Salicylat-Lösung (0,94 M NaOH, 0,94 M Salicylsäure) gebadet und dann unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Auf Nitrocellulose übertragene radioaktiv markierte Proteine wurden nach dem Trocknen der Membran durch Autoradiographie nachgewiesen. Nach Exposition auf Röntgenfilm (Kodak XR5, Kodak BioMax MR, Fuji NewRX) und Entwicklung der Filme (Curix 60-Entwicklermaschine; Agfa-Gevaert) wurden die als Schwärzungen der Filme sichtbaren Signale mit einem Densitometer (ScanJet4c, Hewlett Packard) quantifiziert.

Für das „Photoimaging“ wurde eine durch helles Licht neutralisierte sog. „Image-Plate“ (Fujifilm) für bestimmte Zeit auf den Blot oder das getrocknete Gel aufgelegt, die exponierte Image-Plate in einem „Image-Reader“-Gerät (BAS 1500; Fujifilm) eingelesen und anschließend densitometrisch ausgewertet.

2.4.7 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrocellulosemembranen

Zur Dekoration spezifischer Proteinbanden auf Nitrocellulose-Membranen mittels Antikörpern wurden zunächst unspezifische Proteinbindungsstellen in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer (9 g/l NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) bei Raumtemperatur für 30 min abgesättigt („geblockt“). Die Immundekoration erfolgte für 1 h mit spezifischen Antisera, die 1:200 bis 1:1000 in Milchpulver/TBS verdünnt waren. Anschließend wurde die

Membran je 5 min mit TBS, TBS mit 0,01 % (v/v) Triton X-100 und erneut mit TBS gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte je nach Herkunft des Antikörpers durch Inkubation für 1 h mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG oder Anti-Maus-IgG und Meerrettich-Peroxidase, das 1:10 000 in Milchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die Membran je 5 min mit TBS, 3 mal mit TBS mit 0,01 % (v/v) Triton X-100 und erneut mit TBS gewaschen und schließlich mit Luminol-Reagenz (2,5 mM Aminophthalhydrazit und 0,4 mM p-Cumarsäure in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 plus im Verhältnis 1:1 frisch zugegebene 0,018 %ige (v/v) Wasserstoffperoxidlösung in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5) benetzt. Durch die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion wurden die mit Antikörper markierten Banden mit einem auf den Blot gelegten Röntgenfilm (Fuji NewRX) detektiert.

2.4.8 Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.4.8.1 Silberfärbung

Zur Detektion schwacher Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden diese einer Silberfärbung unterzogen. Dazu wurde das Gel zunächst in einer Lösung aus 12 % TCA und 40 % Methanol 30 min fixiert. Anschließend erfolgte für weitere 30 min ein Waschschrift in 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure. Zur Reduktion der in Gel aufgetrennten Proteine wurde das Gel 20 min in einer frisch angesetzten Lösung aus 4 mM Natriumthiosulfat und 0,13 % Glutaraldehyd inkubiert. Dann wurde ausgiebig (5 x 5 min) in destilliertem Wasser gewaschen. Das eigentliche Färbereagenz wurde durch langsames Eintropfen von 1,2 M Silbernitrat 21 ml 0,1 M NaOH, 1,6 % (w/v) Ammoniak hergestellt. Nach etwa 4 ml wurde die Braunfärbung des eingetropften Silbernitrats durch die vorgelegte Lösung nicht mehr vollständig neutralisiert. Kurz vor Erreichen dieses Umschlagpunktes war die Zubereitung der gesättigten Färbelösung abgeschlossen. Ein leichter Überschuss an Silbernitrat führte zu einem braunen Niederschlag elementaren Silbers, der durch nachträgliche Zugabe weniger μ l einer 20 %igen Ammoniaklösung wieder in Lösung gebracht werden konnte. Die

Färbelösung wurde mit destilliertem Wasser auf 40 bis 100 ml aufgefüllt und das Gel 15 min darin geschwenkt. Die Lösung wurde anschließend in einen Sammelbehälter abgegossen und das Gel erneut 5x 5 mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte bei gedämpftem Licht durch schütteln in 2,5 mM Zitronensäure, 0,02 % Formaldehyd. Die Reaktion wurde vor Erreichen der gewünschten Färbintensität durch Wässern des Gels (2-3 Stunden) in destilliertem Wasser abgebrochen. Während des Wässerns dunkelte das Gel noch nach. Anschließend wurde das Gel zwischen wasserdurchlässiger Folie (Pierce) im Spannrahmen getrocknet.

2.4.8.2 Färbung mit Coomassie-Blau

Die zu färbenden Gele wurden in eine Färbelösung aus 30 % Methanol, 10 % Essigsäure und 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 eingelegt. Die Färbedauer betrug je nach Frische der Lösung zwischen 10 und 30 min. Anschließend wurden die Gele in einer Entfärbelösung aus 30 % Methanol und 10 % Essigsäure und anschließend nur mit aqua dest. partiell entfärbt. Anschließend wurde das Gel für die Autoradiographie auf einem Whatmanfilter unter Vakuum bei 80°C (siehe oben) oder zwischen wasserdurchlässiger Folie (Pierce) im Spannrahmen getrocknet.

2.4.9 Gelfiltration

Zur Fraktionierung von isolierten TOM-Komplexen und Vorstufenproteinen wurden TSK G4000PW_{XL}- (30 cm, 14,3 ml, Toso-Haas) und eine Superose6-Gelfiltrationssäulen (30 cm, 23,5 ml, Pharmacia) verwendet. Die Säulen wurden jeweils mit mindestens 1,5 Säulenvolumen Elutionspuffer (10 % Glycerin bei 50 mM Kaliumacetat und 10 mM MOPS, pH 7,0 und die benötigte Menge an Detergens enthielt; genaue Angaben im Ergebniskapitel) vorequibriert. Eluiert wurde mit mindestens einem Säulenvolumen bei Flußraten zwischen 0,3 und 4,45 ml/min. Die Eichung der Gelfiltrationssäulen erfolgte durch separate Auftrennung der Markerproteine Rinderthyreoglobulin (670 kDa), Pferd milzapoferritin (443 kDa),

Hefealkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und Rindererythrozytencarboanhydrase (29 kDa).

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 Circular-Dichroismus

Die Circular-Dichroismus-Messungen ($CD = A_r - A_l$) wurden an einem Jasco J-715 Spektrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan) in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm (Hellma GmbH, Baden) bei 4°C durchgeführt. A_r und A_l bezeichnen die Absorption von rechts und links polarisiertem Licht. Die spektrale Bandbreite betrug 2 nm. Für jede Probe wurden acht Spektren zwischen 195 und 250 nm aufgenommen. Alle Spektren wurden direkt in einen Personalcomputer eingelesen und mit Hilfe der zum Spektrometer gelieferten Software ausgewertet. Die Auswertung des α -helikalen und β -Faltblattanteils wurde nach einem Algorithmus von Kabsch and Sander, 1983b durchgeführt.

Alle Proben wurden auf analoge Weise für die Messung vorbereitet: Jeweils 500 μ l Proteinlösung (0,5-2 mg/ml) wurden zwei Mal für 24 h gegen 5 mM Kaliumphosphat pH 7,0 dialysiert. Die Proteinkonzentration des Retentats wurde über die UV-Absorption bei 280 nm nach Lambert-Beer bestimmt.

2.5.2 Messung von Infrarot-Spektren

Bei der Absorption von elektromagnetischen Wellen im Infrarotbereich werden in Molekülen Streck- und Rotationsschwingungen angeregt. Die Anregungsfrequenz ist mit abnehmender Bindungsenthalpie und zunehmender Masse der Atome erniedrigt. In Polypeptiden mißt man bei einer Wellenzahl von etwa 3300 cm^{-1} vornehmlich die N-H-Steckungsschwingung, bei 1630-1660 cm^{-1} die C=O-Steckung (Amid-I-Bande) und bei 1520-1550 cm^{-1} die N-H-Deformationsschwingung (Amid-II-Bande). Die Amid-I-Bande wird in einer Weise von der Sekundärstruktur des Proteins

beeinflusst, daß man aus ihr Informationen über diese Struktur erhalten kann.

ATR (attenuated total reflection) Infrarot-Spektren wurden in einem FTIR (Fourier Transform Infrared) Spektrophotometer (Nicolet, Typ 740) einer spektralen Bandbreite von 2 cm^{-1} gemessen. Hierfür wurden 50-100 μg TOM-Komplex, isoliertes Tom40 oder Porin in Lösung auf einen Germaniumkristall, der zuvor in einem sog. „Plasma Cleaner“ hydrophilisiert worden war, aufgetragen und mit einem gleichmäßigen Strom von N_2 -Gas getrocknet. Anschließend wurde der Kristall im Spektrometer montiert. Vor und während den Messungen wurde der Probenraum mit trockenem N_2 begast, um störende Signale von H_2O und CO_2 aus der Atmosphäre zu eliminieren. Für jede Probe wurden 1024 Spektren im Bereich zwischen 1710 cm^{-1} und 1590 cm^{-1} aufgenommen, gemittelt und mit einem Referenzspektrum ohne Protein korrigiert.

Um eindeutig zwischen α -helikalen und ungeordneten Proteinstrukturanteilen bei ca. 1630 cm^{-1} unterscheiden zu können, wurden die Proben auf dem Germaniumkristall des weiteren mit D_2O -gesättigtem N_2 begast. Dadurch wurden H-Atome der zugänglichen Amidgruppen im Protein durch D-Atome ersetzt, so daß α -helikal gebundene von zugänglichen Protonen getrennt werden konnten. Der H-D-Ausstausch wurde durch die Aufnahme von 64 Einzelspektren im Abstand von 5 min verfolgt. Nach 90 min wurde ein Spektrum der deuterierten Probe mit 1024 Einzelspektren aufgezeichnet.

Zur genaueren Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wurde eine Bandenformanalyse nach Kleffel *et al.*, 1985 in einem Bereich um die Amid-I-Bande (1700 bis 1600 cm^{-1}) durchgeführt.

2.5.3 Analytische Ultrazentrifugation

Bei analytischer Ultrazentrifugation unterscheidet man gewöhnlich zwei verschiedene Modi: Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation (engl. Sedimentation velocity) und Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation (engl. Sedimentation equilibrium).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden quantitative Aussagen zur Molekülmasse des isolierten TOM-Core-Komplexes mittels der Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation gemacht. Hierzu wurden 1,6 mg/ml Tom-Core-Komplex in einer 4 mm dicken Küvette bei 7800 rpm bei 20°C über Nacht in einer analytischen Ultrazentrifuge XLA (Beckman) zentrifugiert. Aus der Form des Proteingradienten wurde das Molekulargewicht der Partikel gemäß $MW = 2RT/(1-v_p)\omega^2 * d(\ln c)/dr^2$ errechnet.⁴

Besondere Probleme treten bei der Molekulargewichtsbestimmung von Membranproteinen mittels analytischer Ultrazentrifugation auf. Diese Proteine können nur durch Detergens in Lösung gehalten werden, d.h. die zentrifugierten Partikel bestehen nicht aus dem Protein allein, sondern aus dem Protein plus einer Anzahl Detergensmolekülen. Daher mußte in der oben genannten Formel der Term $(1-v_p)$ durch den entsprechenden $((1-v_{prot}\rho) + \delta_{Det}(1-v_{Dm}\rho))$ korrigiert werden.⁵ Der zweite Teil des neuen Terms war gleich Null, wenn der Kehrwert des partiellen spezifischen Volumens der Detergensmizellen der Dichte der Lösung entsprach (Rosenbusch *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurden die Sedimentationsgleichgewichtszentrifugationen von isoliertem TOM-Komplex unter Bedingungen durchgeführt, in denen die Dichte der Lösung gleich der effektiven Dichte der hydrierten Detergensmizellen war, d.h. unter Bedingungen sog. „gravitational transparency“ (Lustig *et al.*, 2000).⁶

Die Messungen wurden von Ariel Lustig im Biozentrum der Universität Basel mit einer Optima XL-A-Zentrifuge (Beckmann) durchgeführt, die Auswertung in München vorgenommen.

⁴ Es sind: MW = Molekulargewicht; R = allg. Gaskonstante; T = abs. Temperatur bei der Messung; v = spezifisches Volumen der Partikel; ρ = Dichte der Lösung; ω = Winkelgeschwindigkeit bei der Zentrifugation; c = Konzentration; r = Radius.

⁵ Es sind: v = spezifisches Volumen; ρ = Dichte der Lösung; δ = Dichte; prot = Protein; Det = Detergens; Dm = Detergensmizellen.

⁶ Die effektive Dichte ist der Kehrwert des partiellen spezifischen Volumens (Ralston, 1993).

2.6 Elektrophysiologische Methoden

2.6.1 Apparativer Aufbau

Die Leitfähigkeit einzelner TOM-Kanäle wurde in einer selbst angefertigten sog. Black-Lipid-Membrane Apparatur bestimmt. Als Meßzelle diente eine Teflonkammer mit einer Zwischenwand, in der sich ein Loch von 0,5 mm Durchmesser befand. Die Kammer wurde mit ungepufferten 1 M KCl oder mit 1 M KCl, 10 mM Hepes, pH 7,0 befüllt. Über zwei Ag,AgCl / 3 M KCl-Elektroden (Metrohm) konnte eine Gleichspannung von bis zu 500 mV angelegt und ein Stromfluß abgeleitet werden. Mittels eines Strom/Spannungsverstärkers (428 Current Amplifier, Keithley) wurden die Ströme um den Faktor 10^9 V/A verstärkt und über ein Oszilloskop (HM 407, Hameg) und einen Einkanalschreiber (PM 8100, Philips) aufgezeichnet.

2.6.2 Erzeugung von künstlichen Lipid-Doppelschichten

Unter Verwendung von in n-Decan und Butanol gelösten synthetischen Phospholipiden wurden künstliche Lipiddoppelmembranen hergestellt (sog. „black membranes“). Dazu wurde die kreisförmige Öffnung in der Teflonmeßzelle mit 4 µl einer 1 %igen Lösung von Diphytanoyl-Phosphatidylcholine (DPPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) in Chloroform/Methanol (1:1 v/v) beschichtet, wobei das Lösungsmittel durch Verdunstung entfernt wurde. Nach Füllung der Meßzelle mit Meßpuffer, wurde eine mit 4 µl DPPC in n-Decan/Butanol (9:1 v/v) beschichtete Teflonöse quer über die an den Rändern beschichtete Öffnung gezogen, bis sich eine Lipidmembran zwischen die Ränder spannte. Die mittels einer Vergrößerungsoptik beobachtete Totalreflexion dieser Membran (Schwärzung nach Verschwinden der Newton'schen Ringe) zeigte an, daß sich eine Lipiddoppelmembran gebildet hatte (die sog. „black membrane“).

2.6.3 Messung der Ionenleitfähigkeit von TOM-Komplex-Kanälen

Die Insertion von Ionenkanälen wurde durch das Anlegen einer Spannung induziert. Dazu wurde isolierter TOM-Core-Komplex, isoliertes Tom40 oder mitochondriales Porin in einer 0.1 % - 0.5 % DDM-Lösung auf eine Seite der Meßzelle pipettiert und eine Spannung zwischen 20 und 80 mV angelegt. Ein Insertionsereignis wurde über eine Erhöhung der Leitfähigkeit über die Membran registriert.

Um das spannungsabhängige Schließungsverhalten (das sog. „Gating“) der Kanäle zu messen, wurden an die Membran mit inserierten Kanälen verschiedene Spannungen zwischen -120 und +120 mV angelegt.

2.6.4 Messung der Ionenselektivität von TOM-Komplex-Kanälen

Um die Ionenselektivität des TOM-Core-Komplexes und von Tom40 zu messen, wurde zunächst der Einbau von mehreren Kanälen bei 100 mM KCl registriert. Anschließend wurde in einer der Kammern die Salzkonzentration durch wiederholte Zugabe einer hochkonzentrierten Lösung von KCl (3 M) erhöht, während in der anderen Kammer das gleiche Volumen 100 mM KCl zugegeben wurde. Die dabei meßbare Potentialverschiebung war gemäß der Goldman-Gleichung $E_A = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K[K]_a + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_a} \right)$ charakteristisch für die Ionenselektivität des Kanals. Es bedeuten: E_A = gemessenes Potential; R = allg. Gaskonstante; T = abs. Temperatur; F = Faraday-Konstante; P = Permeabilität der Kalium- bzw. Chlorid-Ionen; $[K]_a$ = Konzentration der Kaliumionen außen, die anderen Konzentrationen analog außen und innen.

2.7 Elektronenmikroskopische Methoden

2.7.1 Apparativer Aufbau

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von isoliertem TOM-Komplex und Tom40 wurden mit einem CM12-Transmissionselektronenmikroskop (Philips) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV oder einem CM 200-Mikroskop (Philips) bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV in der Abteilung Prof. Baumeister am MPI für Biochemie in Martinsried angefertigt.

2.7.2 Erzeugung amorpher Kohlefilme auf Kupfernetzchen

Als Träger für die zu untersuchenden Proben wurden amorphe Kohlefilme mit Dicken von rund 10 nm eingesetzt. Die Kohlefilme wurden auf frisch gespaltene Glimmerplättchen (75 mm x 25 mm, Plano, Marburg) in einer Aufdampfanlage bei 5×10^{-6} Torr aufgedampft. Die Kohlefilme wurden auf einer saubere Wasseroberfläche übertragen und mit in Aceton gewaschenen Kupfernetzchen (G 400 TT Cu, Plano, Marburg) herausgefischt und getrocknet.

2.7.3 Erhöhung der Proteinadsorption durch Glühentladung

Um die hydrophobe Oberfläche der Kohlefilmträgerschicht für die Adsorption hydrophiler Proteine zu optimieren, wurden die Probenträger vor dem Aufbringen der Probe in eine selbstgefertigten Glühentladungsapparatur eingebracht. Der Kohlefilm wurde dabei nach Anlegen eines Vakuums und bei einer Wechselspannung von ca. 400 V den Elektronen einer Glühentladungselektrode ausgesetzt. Dadurch wurden Ladungen auf die Kohleschicht aufgebracht, die der Oberfläche einen hydrophileren Charakter verliehen.

2.7.4 Negativ-Kontrastierung der Proben mit Uranylacetat

Zur Kontrasterhöhung der Probe wurde eine Negativ-Anfärbung mit Uranylacetat durchgeführt. Dabei wurde ein Tropfen der Probe auf den Kohlefilm eines Kupferträgers aufgebracht und nach 10-30 sec durch Anlegen eines Filterpapierstückchens (Whatman #1) an der Gitterkante abgezogen. Die Probe wurde danach zweimal mit destilliertem Wasser oder 10 Hepes, pH 7,2 gewaschen, um unerwünschte Probenpuffersubstanzen - insbesondere Detergens - zu entfernen. Die Waschlösung wurde ebenfalls mit Filterpapier abgezogen. Anschließend wurde ein Tropfen der Uranylacetat-Lösung auf das Gitter aufgebracht und 30-60 sec. dort belassen. Überschüssige Kontrastmittellösung wurde mittels Filterpapier entfernt und der Vorgang einmal wiederholt. Abschließend wurde der Probenträger an der Luft getrocknet.

2.7.5 Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen durch rechnergestützte Bildanalyse

Elektronenmikroskopische Aufnahmen auf Film wurden mit Hilfe eines Eikonix Densitometers bei einer Schrittweite von 0,34 nm pro Pixel digitalisiert oder – wenn es sich um Aufnahmen mit einer Digitalkamera (Photometrics) handelte – direkt weiterverarbeitet. Die Auflösung betrug dabei 2048 x 2048 Bildpunkte bei einer Kontrasttiefe von 16 bit. In am CM12-Mikroskop bei 43800 facher Vergrößerung gemessenen Bilder ergaben sich Bildpunkte mit einer Pixelgröße von 0,34 nm Seitenlänge. Die Verarbeitung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe des EM-Programmpakets von R. Hegerl (Hegerl, 1996).

2.8 Regenerierung von Ni-NTA-Säulenmaterial

Zur Regenerierung gebrauchten Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)- Säulenmaterials (Quiagen) wurden 50 ml dieses Materials in eine Chromatographiesäule gepackt und folgende Waschschrirte bei einer Flußrate von ca. 1 ml/min durchgeführt:

- 1.) 10 Säulenvolumen 7 M Harnstoff, 0,2 M Essigsäure.
- 2.) 10 Säulenvolumen aqua dest.
- 3.) 15 Säulenvolumen 2 % SDS.
- 4.) 5 Säulenvolumen 50 % Ethanol techn.
- 5.) 5 Säulenvolumen 100 % Ethanol techn.
- 6.) 5 Säulenvolumen Ethanol techn.
- 7.) 5 Säulenvolumen aqua dest.
- 8.) 10 Säulenvolumen 100 mM EDTA, pH 8,0.
- 9.) 50 Säulenvolumen aqua dest.
- 10.) 15 Säulenvolumen 100 mM Nickel(III)sulfat.
- 11.) 5 Säulenvolumen aqua dest.
- 12.) 5 Säulenvolumen 7 M Harnstoff, 0,2 M Essigsäure.
- 13.) 5 Säulenvolumen aqua dest.

Das regenerierte Material wurde in 30 % Ethanol p.a. bei 4°C gelagert.

Mit Harnstoff und Essigsäure wurden unspezifisch gebundene Stoffe weitgehend gewegewaschen, mit EDTA das an das Material gebundene Nickel entfernt, durch Spülen mit Nickelsulfat das Material wieder mit Nickelionen beladen.

2.9 Geräte, Chemikalien und Enzyme

2.9.1 Geräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklerrnaschine Gevomatic 60

BDK, Hamburg: Sterilbank

Beckman Instruments, München: Kùhlzentrifugen J2-21 incl. Rotoren

Bender und Hobein, München: Vortex-Mixer
Bio-Rad, München: "Gene Pulser" für Elektroporation
Biometra, Göttingen: programmierbarer Thermostat für PCR-Reaktionen
Braun, Melsungen: Schüttelwasserbäder und Schüttler "Certomat"
Eppendorf, Hamburg: Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen
Fuji, Düsseldorf: Phosphoimaging BAS-Reader System
G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd: Branson Sonifier 250
Heraeus Christ, Osterode: Tischzentrifugen, Wärmeschränke
Jasco, Japan: Uvidec-4 Spectrophotometer
Memmert, Hannover: Wärmeschränke
Pharmacia, LKB, Freiburg: Spannungsgeräte
Philipps, Eindhoven, Niederlande: Philipps CM12 Elektronenmikroskop
Sartorius, Mainz: Feinwaagen, Sterilfilter
Schütt, Göttingen: Autoclav "Bioclav"
Shimadzu, Kyoto, Japan: Spectrophotometer UV 240
Sigma, München: Kühlzentrifuge MK

2.9.2 Chemikalien und Enzyme

Amersham, Braunschweig: Luminol-Reagenz (ECL), ³⁵S-Methionin
Anatrace, Maumee, Ohio, USA: n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid
Avanti Polar Lipids, Birmingham, USA: Phospholipide
Behringwerke, Marburg: Freund's inkomplettes Adjuvans
Biometra, Göttingen: Kit für die Polymerase-Kettenreaktion ("Prime Zyme")
Biorad, München: Agarose, Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und Meerrettich-Peroxidase, Proteinreagenz und Proteinstandard für die Proteinbestimmung ("Proteinassay")
CytRX, Norcross, USA: Immunstimulanz "Titer Max"
Difco Lab., Detroit, USA: Bacto-Agar, Bacto-Hefe-Extrakt, Bacto-Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton
Eurogentec, Seraing, Belgien: Oligonukleotide
Fluka, Buchs, CH: TCA
Genomed, Bad Oeynhausen: Kit zur Präparation von Plasmid-DNA ("Jetstar")

Gerbu, Galberg: DTT, NADH

Gibco/BRL, Eggenstein: Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase

Merck, Darmstadt: Aceton, Aminosäuren, Ammoniumcetat, Chloroform, Dimethylsulfoxid, Digitonin, EDTA, Essigsäure, Galactose, Glucose, Glycerin, Glycin, HCl, H₂SO₄, Isoamylalkohol, Isopropanol, KCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, Kaliumacetat, KOH, LiCl, Methanol, MgCl₂, Magnesiumacetat, MgSO₄, Milchsäure, MnCl₂, Natriumacetat, Natriumcitrat, NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaOH, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, Phenol, Saccharose, Salicylsäure, Sorbitol, Tris, Triton X-100

Nestle, München: Magermilchpulver

New England Biolabs, Schwalbach, Taunus: Restriktionsenzyme

Pharmacia, Uppsala, Schweden: Desoxyribonukleotide, 7-Methyl-guanosin-triphosphat (m⁷ G(5')ppp(5')XG), ProteinA-Sepharose (PAS), Ribonukleotide

Promega, Madison, USA: Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin), Retikulozytenlysat, RNasin, SP6-Polymerase

Roche Diagnostics, Mannheim: ATP, Creatinkinase, Proteinase K, Restriktionsenzyme

Schleicher und Schnell, Kassel: Nitrocellulose BA83

Seikagaku Kogyo, Tokyo: Zymolyase

Serva, Heidelberg: Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie-Brilliant-Blau R-250, DTT, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Ponceau S, SDS, TEMED,

Sigma, München: Agarose, Aminosäuren, Ampicillin, APS, Apyrase Grade VIII, Creatinphosphat, Ethidiumbromid, β-Mercapto-ethanol, Mineralöl, Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, MOPS, Oligomycin, Percoll, Phenylmethylsulfonsäure (PMSF), Rinderserumalbumin (BSA), Trypsin, Trypsin-Inhibitor (STI; aus Sojabohne), Uracil, Valinomycin

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und biochemische Charakterisierung des TOM-Core-Komplexes von *Neurospora crassa*

Bisherige Untersuchungen zur oligomeren Stabilität des TOM-Komplexes hatten ergeben, daß die Rezeptoren Tom70 und Tom20 weniger fest als die anderen Tom-Komponenten am TOM-Komplex assoziiert sind (Künkele *et al.*, 1998a). Möglicherweise lag hierin die strukturelle Ursache für das Auftreten der sog. Ein-, Zwei und Dreiloch-Partikel in elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Im Folgenden wird die Isolierung spezifischer TOM-Subkomplexe beschrieben. Damit sollte die essentielle Struktur des mitochondrialen Proteintranslokationskanals herausgearbeitet werden. Zunächst werden weitere Untersuchungen zur oligomeren Stabilität des TOM-Komplexes dargelegt und Bedingungen beschrieben, unter denen sich ein TOM-Komplex ohne die Rezeptorkomponenten Tom70 und Tom20 isolieren läßt. Schließlich wird beschrieben, wie dieser Komplex hinsichtlich seiner Zusammensetzung, Molekularmasse und Stöchiometrie charakterisiert wurde. Dabei wurde eine bisher nicht bekannte Komponente im TOM-Komplex identifiziert.

3.1.1 Zerlegung des TOM-Holo-Komplexes

Um TOM-Subkomplexe isolieren zu können, wurde die oligomere Stabilität von isoliertem TOM-Holo-Komplex aus *Neurospora crassa* in Gegenwart verschiedener Detergentien getestet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Oligomere Stabilität des TOM-Holo-Komplexes in Gegenwart verschiedener Detergentien

Detergens	Typ	CMC (mM)	Einge- setzte Konz.	Ergebnis
Digitonin	Nichtionisch		0,5 %	Komplex stabil
Triton X-100	Nichtionisch	0,23	0,33 %	Zerlegung und Aggregation
Genapol X-080	Nichtionisch	0,15	0,33 %	Zerlegung und Aggregation
n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM)	Nichtionisch	0,17	0,33 %	Abdissoziation der Rezeptoren
Natriumcholat	Ionisch	9,0	1,0 %	teilweise Abdissoziation der Rezeptoren
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ionisch	2,6	0,33 %	Komplette Zerlegung

Isolierter TOM-Holo-Komplex wurde mit nicht-ionischen und ionischen Detergentien inkubiert und anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie hinsichtlich seiner oligomeren Stabilität untersucht (Abb.12). Während die Hauptfraktion in Digitonin alle bisher bekannten Tom-Komponenten enthielt, fehlten in der Hauptfraktion in Dodecylmaltosid (DDM) die Komponenten Tom70 und Tom20. In Dodecylmaltosid koeluierten Tom40, Tom22, Tom6 und Tom7 in einem Komplex von etwa 410 kDa. Inkubation von TOM-Holo-Komplex mit Triton X-100, Genapol X-080 oder Cholat ergab kein eindeutiges Bild. Die gelchromatographische Analyse führte hier zu mehreren Fraktionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der einzelnen Tom-Komponenten (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet führte die Inkubation des Holo-Komplexes mit SDS zu einer vollständigen Zerlegung in die einzelnen Tom-Komponenten. Dem entsprechend wurden Tom70, Tom40, Tom22 und Tom20 weitgehend in Fraktionen niedrigen Molekulargewichts nachgewiesen.

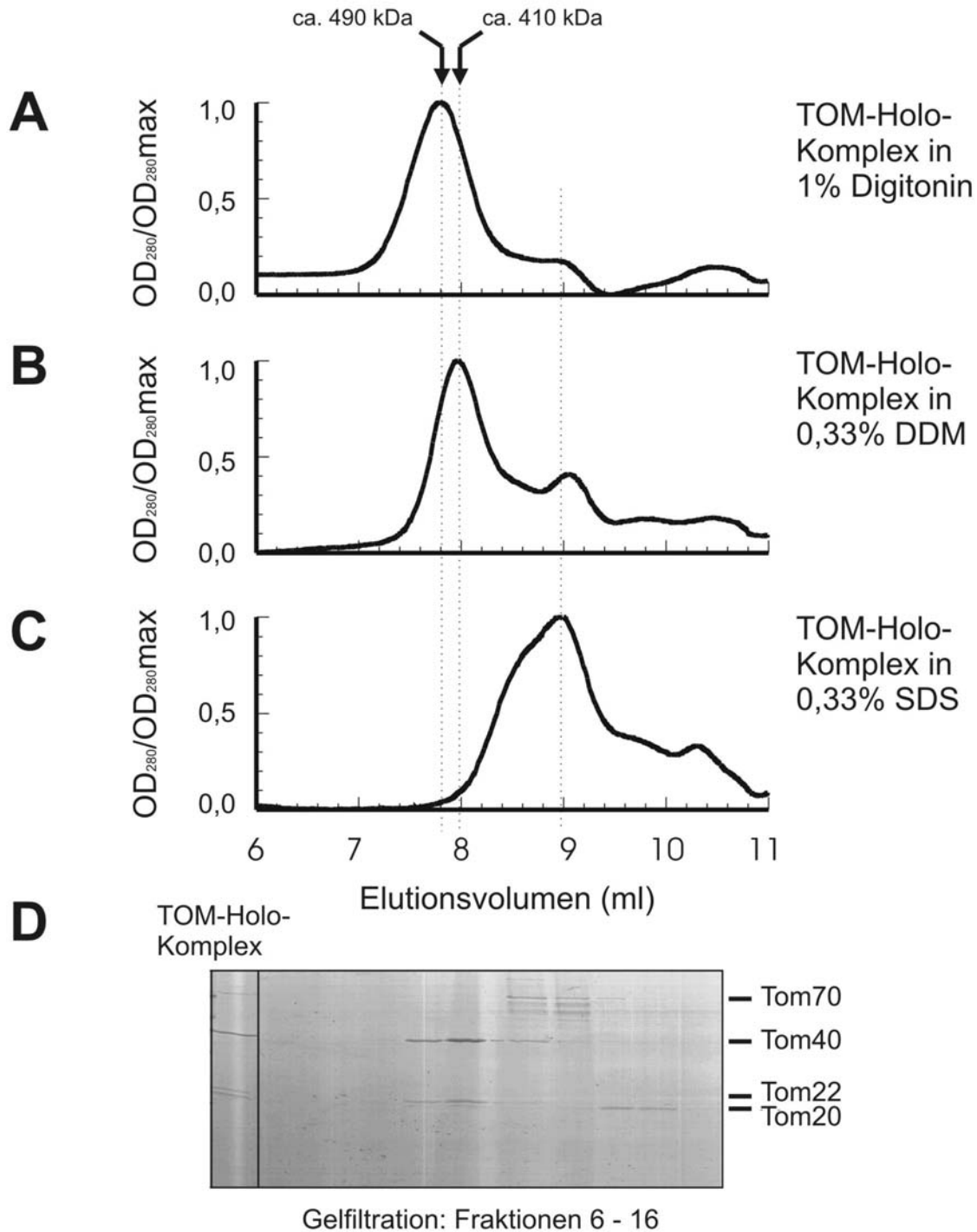


Abbildung 12: Oligomere Stabilität des TOM-Holo-Komplexes in Gegenwart verschiedener Detergentien

1 mg/ml TOM-Holo-Komplex wurde für 30 min bei 4°C in 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin und dem Detergens Digitonin (A), DDM (B) oder SDS (C) inkubiert (vgl. 2.2.5). Anschließend wurden die Ansätze mittels Gelfiltrationschromatographie auf einer TSK G4000PW_{XL}-Säule untersucht. Die Elution erfolgte in diesen Versuchen immer mit 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 0,5 % Digitonin (siehe 2.3.8). Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile für den TOM-Holo-Komplex (A), nach Inkubation mit 0,33 % DDM (B) und mit 0,33 % SDS (C). D: Coomassie-gefärbtes Gel der Fraktionen des Gelfiltrationslaufes B. Dabei korrespondieren die Fraktionen zum Elutionsvolumen der Elutionsprofile.

3.1.2 Isolierung und Aufreinigung des TOM-Core-Komplexes

Die im letzten Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse über die oligomere Stabilität des TOM-Holo-Komplexes konnten nun dazu eingesetzt werden, einen TOM-Subkomplex ohne die Rezeptoren Tom70 und Tom20 zu isolieren. Dieser Subkomplex wird im Folgenden als TOM-Core-Komplex bezeichnet. Um möglichst große Mengen an hochreinem und homogenem Material für funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das im Gegensatz zur Isolierung des TOM-Holo-Komplexes aus mitochondrialen Außenmembranvesikeln die direkte Isolierung aus Mitochondrien erlaubt. Dies führte zu Ausbeuten von durchschnittlich 10 mg TOM-Core-Komplex pro 5 g Mitochondrienprotein.

Zunächst wurde die Aufreinigung von TOM-Core-Komplex analog zu der des TOM-Holo-Komplexes aus Außenmembranvesikeln mit Hilfe des Detergens Dodecylmaltosid etabliert. Dies erbrachte aus 30 mg Außenmembranvesikeln ca. 0,5 mg weitgehend von Verunreinigungen freiem TOM-Core-Komplex. Bereits während der Solubilisierung der mitochondrialen Außenmembranproteine dissoziierten Tom70 und Tom20 vom TOM-Holo-Komplex ab (Daten nicht gezeigt).

Da nur etwa 4 % der gesamten Außenmembran von *Neurospora*-Mitochondrien isoliert werden können (Künkele, 1999) und die Ausbeute an isoliertem TOM-Core-Komplex weiter optimiert werden sollte, wurde nachfolgend versucht, TOM-Core-Komplex direkt aus ganzen Mitochondrien zu isolieren.

Die Proteinmenge in der Außenmembran entspricht in etwa 6 % der gesamten mitochondrialen Proteinmenge (Mayer *et al.*, 1993). Da der TOM-Komplex ca. 3 % des Proteins in Außenmembranvesikeln ausmacht, sollte der TOM-Komplex in Mitochondrien zu einem Anteil von 0,2 % vorhanden sein (Kiebler *et al.*, 1990). Die optimale Menge an Mitochondrien, die als Ausgangsmaterial einer Isolierung diene, wurde mit 5 g bestimmt. Dabei war es für die Isolierung des TOM-Core-Komplexes unerheblich, ob frisch

isolierte Mitochondrien oder bei -20°C gelagerte Mitochondrien als Ausgangsmaterial verwendet wurden.

Der Ni-NTA-Affinitätschromatographieschritt, der auch der Aufreinigung des TOM-Holo-Komplexes zugrundeliegt (siehe 2.2.4), wurde beibehalten. Er wurde aber durch einen zweiten Schritt ergänzt. Durch Einführung eines Anionenaustauschers als zweiten Chromatographieschritt (Abb.13A) konnte auf Waschen des gebundenen Proteins im ersten Schritt unter allzu stringenten Bedingungen verzichtet werden. Wurden die Bedingungen im ersten Chromatographieschritt stringent gewählt (30 mM Imidazol im Waschpuffer, 20 Säulenvolumen), dann lag die Ausbeute bei etwa 30 % der maximal erreichbaren Ausbeute.

Die Verwendung von regeneriertem statt neuem Ni-NTA-Material führte zu einer Erhöhung der Ausbeute auf etwa das Doppelte. Vermutlich wurde TOM-Komplex aufgrund unspezifischer Bindung des Komplexes an frisches Ni-NTA-Material nicht eluiert.

Die Reinigung des TOM-Core-Komplexes aus ganzen Mitochondrien führte häufig zum partiellen Abbau der im Komplex enthaltenen Komponenten Tom22, Tom6 und Tom7 (Abb.13A). Wie durch N-terminale Edman-Sequenzierung nachgewiesen, enthielt die Bande unter der Tom22-Bande ein um vier Aminoacylreste verkürztes Tom22 (Tom22*). Der Grund für den partiellen Abbau wurde in den in *Neurospora crassa*-Hyphen und Mitochondrien vorhandenen Proteasen gefunden, die während der Isolierung von ihren natürlichen Inhibitoren getrennt und aktiv wurden.

Um dem proteolytischen Abbau wirksam zu begegnen, wurden zwei Maßnahmen ergriffen: Zum einen wurde während der Mitochondrien-isolierung ein Protease-Inhibitormix (Complete-EDTA-free(Roche)) bis zum Auftrag von solubilisierten mitochondrialem Membranprotein auf die Ni-NTA-Säule zugegeben, zum anderen wurde die Dauer der Komplexisolierung verkürzt.

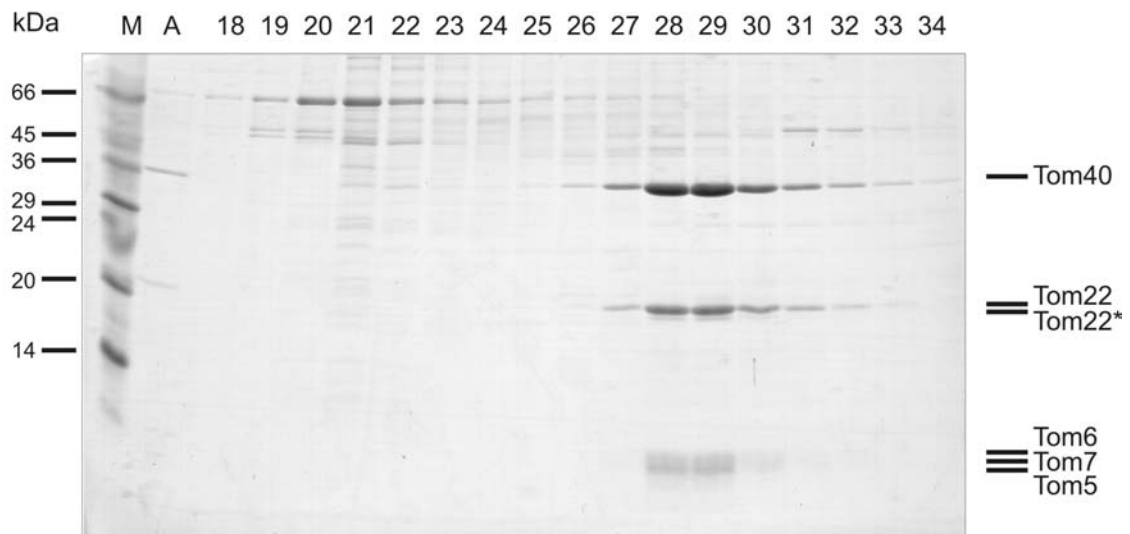
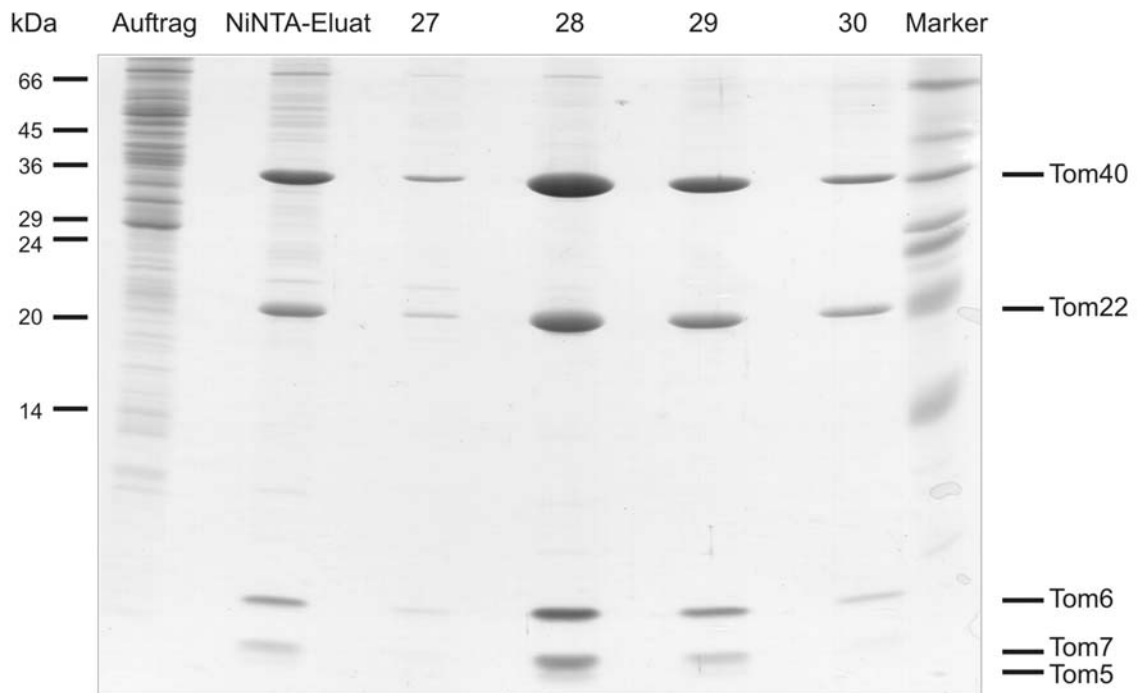
A**B**

Abbildung 13: TOM-Core-Komplexreinigung

(A) Aufreinigung des TOM-Core-Komplexes, bestehend aus den Komponenten Tom40, Tom22, Tom5, Tom6 und Tom7, mittels einer ResourceQ-Anionenaustauschersäule (Fraktionen 28 bis 30). In den Fraktionen 20 bis 23 sind die auf der ResourceQ-Säule abgetrennten, hauptsächlichen Verunreinigungen zu sehen, die noch im NiNTA-Eluat zu finden sind. M, Molekulargewichtsmarker; A, Auftrag auf die ResourceQ-Säule (10 µg); 18-35, Fraktionen, die von der ResourceQ-Säule eluiert wurden; Tom22*, Abbaubande von Tom22. (B) Coomassie-High-Tris-Harnstoff-Gel. Links Marker (14-66 kDa); Auftrag, 150 µg in DDM solubilisierte Mitochondrien; NiNTA-Eluat, 150 µg Ni-NTA-Eluat; 27-30, Fraktionen der ResourceQ-Elution. In der Spalte „Fraktion 28“ sind 150 µg, in den anderen gleiches Volumen wie in „Fraktion 28“ und also entsprechend weniger Protein aufgetragen.

Für letzteres waren verschiedene Maßnahmen nötig. Da die Flußrate beim Auftrag der solubilisierten Mitochondrien auf die Ni-NTA-Affinitätssäule nicht einfach erhöht werden konnte, ohne daß dies einen Verlust an Bindung des TOM-Komplexes an das Ni-NTA-Material verursachte, mußte die Dimension der Säule verändert werden. Bei gleicher Verweilzeit von TOM-Komplex auf der Säule konnten solubalisierte Mitochondrien auf eine Säule mit einem Durchmesser von 5 cm mit einer um das Vierfache höheren Flußrate aufgetragen werden als auf eine Säule von gleicher Länge mit 2,5 cm Durchmesser. Da auch anschließende Waschschrirte schneller durchgeführt werden konnten, konnte die Zeit, die der Ni-NTA-Säulenschritt einnahm, um etwa 60 % auf etwa 5 Stunden verkürzt werden.

Auf eine Analyse des ersten Aufreinigungsschrittes vor Durchführung des zweiten konnte infolge guter Reproduzierbarkeit verzichtet werden. Das Eluat der Ni-NTA-Säule wurde direkt auf die Ionenaustauscher-Säule aufgetragen.

Durch Verwendung einer 6 ml-ResourceQ-Säule (Pharmacia) statt einer MonoQ(HR5/5)-Säule (Pharmacia) konnte schließlich auch die Dauer des zweiten Reinigungsschrittes um 50 % auf etwa 3 Stunden verkürzt werden. Maßgeblich hierfür war insbesondere die Wahl des Säulenträgermaterials. Die MonoQ-Säule enthält hydrophile Polyetherkügelchen von etwa 10 µm Durchmesser, die ResourceQ-Säule mit Divinylbenzen vernetzte Polystyrenkügelchen von 15 µm Durchmesser. Letztere konnte daher bei niedrigerem Rückdruck mit höheren Flußraten betrieben werden. Der Einsatz des ÄKTA-Purifiers für diesen Reinigungsschritt erlaubte direkte Kontrolle der Elution des Proteins von der Ionenaustauschersäule über die Absorptionsmessung bei 280 und 260 nm. Der TOM-Core-Komplex konnte so innerhalb eines Arbeitstages hochrein aus Mitochondrien isoliert werden.

Die Optimierungsschritte, die an der Isolierungs- und Reinigungsprozedur des TOM-Core-Komplexes vorgenommen wurden, sind in Tabelle 2 und Abb.13B nochmals zusammengefaßt.

Tabelle 2: Optimierung der TOM-Core-Komplex-Isolierung:

Parameter	Startbedingungen	Optimierung	Effekt
Ausgangsmaterial	Außenmembranvesikel	Mitochondrien	Ausbeute um ca. das 20fache erhöht
Anzahl der Reinigungsschritte	Ni-NTA-Säule als einzigen Aufreinigungsschritt	2-Schritt-Aufreinigung mit Ionenaustauscher als 2. Schritt	Aufreinigungsfaktor um mindestens das Doppelte erhöht; Aufkonzentration des gereinigten Komplexes
Waschstringenz im Ni-NTA-Schritt	30 mM Imidazol für 20 Säulenvolumen	20 mM Imidazol für 10 Säulenvolumen	Bis zu 2,7fache Ausbeute; mehr Kontaminationen im 1. Aufreinigungsschritt
Ni-NTA-Material	Neues Ni-NTA-Material	Regenieriertes Ni-NTA-Material	Erhöhung der Ausbeute auf etwa das Doppelte
Geschwindigkeit des 1. Reinigungsschrittes	Ni-NTA-Säule mit 2,5 cm Durchmesser	Ni-NTA-Säule mit 5 cm Durchmesser	Geschwindigkeit von Auftrag und Waschen 4fach erhöht; weniger proteolytischer Abbau
Geschwindigkeit des 2. Reinigungsschrittes	MonoQ(HR5/5)-Säule	6ml-ResourceQ-Säule	Höhere Geschwindigkeiten im zweiten Aufreinigungsschritt

Tabelle 3 zeigt die Ausbeuten und Anreicherungs faktoren, die bei der TOM-Core-Komplexisolierung erreicht wurden. Die Anreicherungs faktoren wurden durch densitometrische Quantifizierung von Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen bestimmt. Typische Anreicherungs faktoren lagen für den TOM-Core-Komplex bezüglich des Gesamtproteingehalts der Probe über 200. Mitochondriales Porin war weder in Coomassie-gefärbten Acrylamidgelen noch mittels Immunodekoration von geblottetem Protein in TOM-Core-Komplex-Isolierungen nachweisbar. Der Aufreinigungsfaktor von TOM-Core-Komplex bezüglich mitochondrialen Porins konnte daher nur auf über 5000 geschätzt werden.

Tabelle 3: Reinigungstabellen zur Aufreinigung von TOM-Core-Komplex

A) Eine Aufreinigung unter stringenten Waschbedingungen im 1. Schritt (Ni-NTA):

Probe	Volu- men (ml)	Pro- tein (mg/ ml)	Protein abso- lut (mg)	Aus- beute an Pro- tein (%)	Anteil an TOM- Core- kom- plex (%)	Menge an TOM- Core- komplex abs. (mg)	Wieder- findung TOM- Core- komplex (%)	Anrei- cherung TOM- Core- komplex relativ	Anrei- cherung TOM- Core- komplex absolut
Mitochondrien	500	10	5000	100	0,426	21,3	100	1	1
Eluat Ni-NTA	45	0,40	18	0,36	69,1	12,4	58,2	162,2	162,2
Eluat ResourceQ	2	3,36	6,7	0,14	85,7	5,74	26,9	1,24	201,5
(Hauptfraktion Eluat ResourceQ)	0,5	4,81	2,4	0,05	93,4	2,24	(10,5)	1,35	219,4

In den Mitochondrien betrug das Verhältnis Tom40/mt-Porin $0,43\% / 11,6\% = 0,0367$. Im Eluat der Ni-NTA betrug das Verhältnis Tom40/mt-Porin $69,1\% / 0,52\% = 132,88$. Das heißt, daß das Tom40 im Verhältnis zum Porin schon im ersten Schritt um den Faktor 3621 angereichert wurde. Im 2. Schritt war Porin nicht mehr detektierbar, so daß sich kein Aufreinigungsfaktor ermitteln ließ. Er läßt sich nur schätzen auf insgesamt mindestens >5000.

B) Eine Aufreinigung unter weniger stringenten Waschbedingungen im 1. Schritt (Ni-NTA):

Probe	Volu- men (ml)	Pro- tein (mg/ ml)	Protein abso- lut (mg)	Aus- beute an Pro- tein (%)	Anteil an TOM- Core- kom- plex (%)	Menge an TOM- Core- komplex abs. (mg)	Wieder- findung TOM- Core- komplex (%)	Anrei- cherung TOM- Core- komplex relativ	Anrei- cherung TOM- Core- komplex absolut
Mitochondrien	500	10	5000	100	0,45	22,5	100	1	1
Eluat Ni-NTA	45	0,74	33,3	0,67	38,4	12,8	56,8	85,3	85,3
Eluat ResourceQ	2	3,71	7,42	0,15	65,3	4,85	21,6	1,7	145,1
(Hauptfraktion Eluat ResourceQ)	0,5	5,11	2,55	0,05	71,2	1,82	(8,1)	1,85	158,2

In den Mitochondrien betrug das Verhältnis Tom40/mt-Porin $0,45\% / 10,8\% = 0,0417$. Im Eluat der Ni-NTA betrug das Verhältnis Tom40/mt-Porin $38,4\% / 0,6\% = 64$. Das heißt, daß das Tom40 im Verhältnis zum Porin schon im ersten Schritt um den Faktor 1535 angereichert wurde. In der Hauptfraktion des Eluats der ResourceQ betrug das Verhältnis Tom40/mt-Porin $71,2\% / 0,45\% = 158,2$. Das heißt, daß das Tom40 gegenüber dem Porin noch einmal um den Faktor von ca. 2,5 aufgereinigt wurde, insgesamt also etwa um den Faktor 3840.

3.1.3 Tom5 in *Neurospora crassa*

In Coomassie-gefärbten, hochauflösenden SDS-Harnstoff-Polyakrylamid-Gelen des gereinigten TOM-Core-Komplexes wurde eine bisher nicht identifizierte Proteinbande unterhalb der Bande des Tom7 beobachtet (Abb.14A). Zur Identifizierung dieses Proteins wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das Protein wurde in der Arbeitsgruppe von Lutz Eichacker am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität aus dem Gelstück extrahiert und mit Trypsin verdaut. Anschließend wurde die Sequenz der Peptidfragmente mit Hilfe von massenspektroskopischen Methoden ermittelt (Abb.14B). Die Sequenzen der Peptide waren keinen der bisher bekannten Komponenten des TOM-Komplexes von *Neurospora crassa* zuzuordnen. Zur Kontrolle wurden die Banden von Tom6 und Tom7 ebenfalls ausgeschnitten und auf die selbe Art untersucht. Die so gefundenen Peptide waren erwartungsgemäß Fragmente von Tom6 und Tom7 (Abb.14B). Durch eine Suche in cDNA-Datenbanken von *Neurospora crassa* konnte das zu den unbekannten Fragmenten gehörige Gen identifiziert werden (Klon Nr. e4g06ne.r1, „*Neurospora crassa* evening cDNA library“, University of Oklahoma).

Die Nukleotidsequenz der neu identifizierten cDNA und die dazugehörige Proteinsequenz sind in Abb.17C wiedergegeben. Es handelt sich in Übereinstimmung mit der Größe des Proteins der aus dem Gel ausgeschnittenen Bande um ein Protein mit 50 Aminoacylresten und einer Molekülmasse von 5,4 kDa. Dieselbe Länge weist Tom5 aus *Saccharomyces cerevisiae* auf (Dietmeier *et al.*, 1997). Der Sequenzvergleich des neu identifizierten Protein aus *Neurospora crassa* mit Tom5 aus Hefe ergab eine Identität von 31 % aller Aminoacylreste (Abb.14D). Auch die Hydrophobizitätsprofile beider Proteine mit jeweils einer potentiellen Transmembranregion nahe des Carboxyterminus' ähneln sich. Das mit dem TOM-Komplex aufgereinigte Protein wurde darum als „*Neurospora crassa*-Tom5“ benannt.

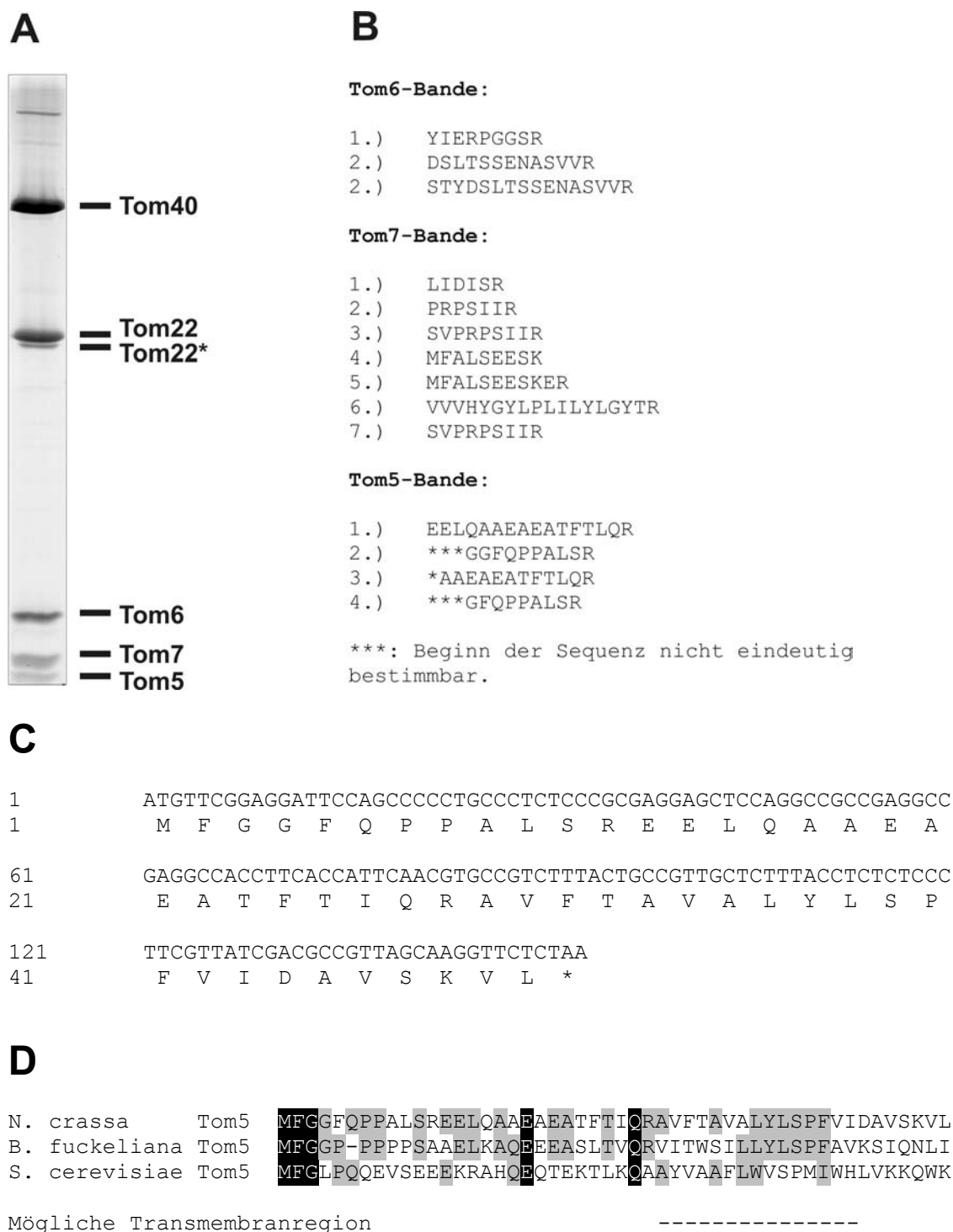


Abbildung 14: Tom5 in *Neurospora crassa*:

(A) Coomassie gefärbtes SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgel, auf dem die Proteinkomponenten von 150 µg TOM-Core-Komplex aufgetrennt sind. Tom22* bezeichnet eine Abbaubande von Tom22. (B) Sequenzen von Proteinfragmenten. Die Fragmente stammen aus Banden aus dem in (A) gezeigten Gel. Die Sequenzen wurden mittels massenspektroskopischer Methoden ermittelt. (C) Nukleotidsequenz der cDNA des Tom5 in *Neurospora crassa* und die dazugehörige Proteinsequenz. (D) Vergleich der Proteinsequenz des Tom5 aus *Neurospora crassa*, der Sequenz des potentiellen Tom5 aus *Botrytis fuckeliana* und der schon bekannten Sequenz von Tom5 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Dietmeier *et al.*, 1997).

Durch weitere cDNA-Datenbanksuchen konnte schließlich die cDNA eines weiteren potentiellen Tom5's in dem Pilz *Botryotinia fuckeliana* identifiziert werden (Nr.AL110849, Botrytis cinerea strain T4 cDNA). Das dazugehörige Protein besteht aus 49 Aminoacylresten, zeigt 44 % Identität zum *Neurospora*-Protein und eine dem *Neurospora*-Tom5 ebenfalls sehr ähnliche Hydrophobizitätskurve mit einer potentiellen Transmembrandomäne.

3.1.4 Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes

Die native Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes wurde auf Grundlage von drei verschiedenen Methoden bestimmt: Nativgelelektrophorese, Gelfiltration und analytische Ultrazentrifugation.

Die Analyse mittels eines kommerziellen Nativgelsystems, das auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinkomplexen in niederprozentigen Acrylamidgelen im Alkalischen beruht, ergab, daß der TOM-Holo-Komplex eine Molekülmasse von ca. 500 kDa hat (Abb.15A). Mittels Immunoblotting konnten die Komponenten Tom70, Tom40, Tom22, Tom20 und Tom6 in dem TOM-Holo-Komplex nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Tom5 und Tom7 konnten mangels geeigneter Antiseren nicht explizit nachgewiesen werden. Es ist aber davon auszugehen, daß neben Tom6 auch Tom7 und Tom5 in der dem Holo-Komplex entsprechenden Bande vorhanden sind. Überraschenderweise waren der TOM-Holo-Komplex und der TOM-Core-Komplex auf Grundlage dieser Methode ähnlich hochmolekular (Abb.15A), obwohl im Core-Komplex die Komponenten Tom70 und Tom20 fehlten. Da in der alkalischen Nativgelelektrophorese nur die Oberflächenladung und die Größe der Proteine für die Migrationsgeschwindigkeit verantwortlich sind, kann die apparente Molekülmasse von der wirklichen abweichen. Da in der blauen Nativgelelektrophorese durch den blauen Farbstoff Coomassie negative Ladungen auf die Proteine aufgebracht werden, ist das Laufverhalten in höherem Maße von der Größe des Proteins abhängig als in der alkalischen Nativgelelektrophorese. Blaue Nativgelelektrophorese ergab eine native Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes von ca. 400 kDa (Abb.15B). Die Größe des TOM-Core-Komplexes aus Außenmembranvesikeln

wich in blauer Nativgelelektrophorese kaum von dem des TOM-Komplexes ab (Abb.15C). Mittels Immunoblotting konnten die Komponenten Tom40, Tom22 und Tom6 in dem 400 kDa-Komplex nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

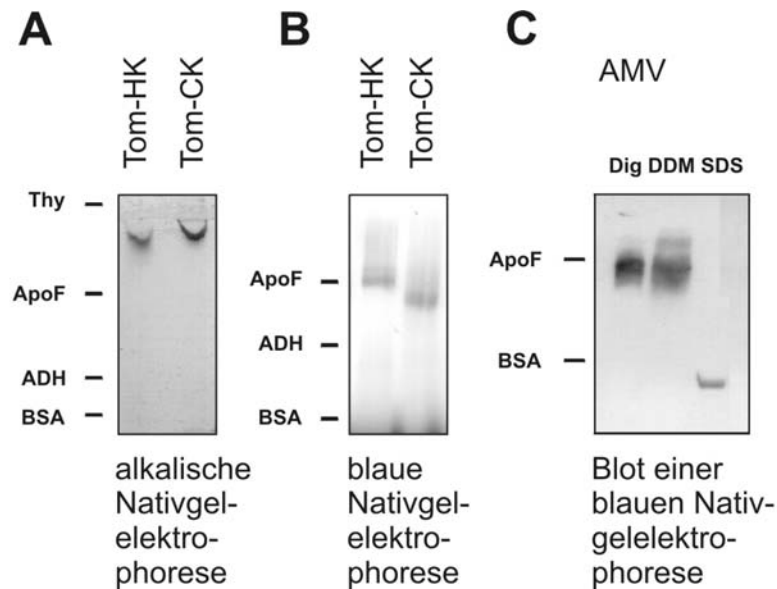


Abbildung 15: Bestimmung der Molekülmasse von TOM-Core-Komplex mittels Nativgelelektrophorese

A: Coomassie-gefärbtes Nativgel (PhastSystem) von gereinigtem TOM-Holo-Komplex (TOM-HK) und gereinigtem TOM-Core-Komplex (TOM-CK). B: Blaues Nativgel (ungefärbt) von gereinigtem TOM-Holo-Komplex (TOM-HK) und gereinigtem TOM-Core-Komplex (TOM-CK). C: Der mit gegen Tom40 gerichteten Antikörpern dekorierte Westernblot eines blauen Nativgels. Jeweils 100 µg Außenmembranvesikel (AMV) wurden vor dem Auftrag in 1 % Digitonin, DDM oder SDS solubilisiert. Markerproteine: Thyreoglobulin (Thy, 669 kDa), Apoferritin (ApoF, 443 kDa), Alkoholdehydrogenase (ADH, 150 kDa) und Albumin (BSA, 66 kDa).

Offensichtlich dissoziierten in der blauen Nativgelelektrophorese die Rezeptoren Tom70 und Tom20 weitgehend vom TOM-Holo-Komplex ab. Im Gel blieb nur der TOM-Core-Komplex stabil und war als hochmolekulare Bande detektierbar. Vermutlich destabilisierte Coomassie den TOM-Holo-Komplex. In SDS war der TOM-Komplex vollständig zerlegt worden (Abb.15C; vgl. Abb12C).

In Übereinstimmung mit obigen Ergebnissen ergab die Analyse von isoliertem TOM-Core-Komplex mittels Gelfiltrationschromatographie (Abb.16) eine native Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes von ca. 410 kDa.

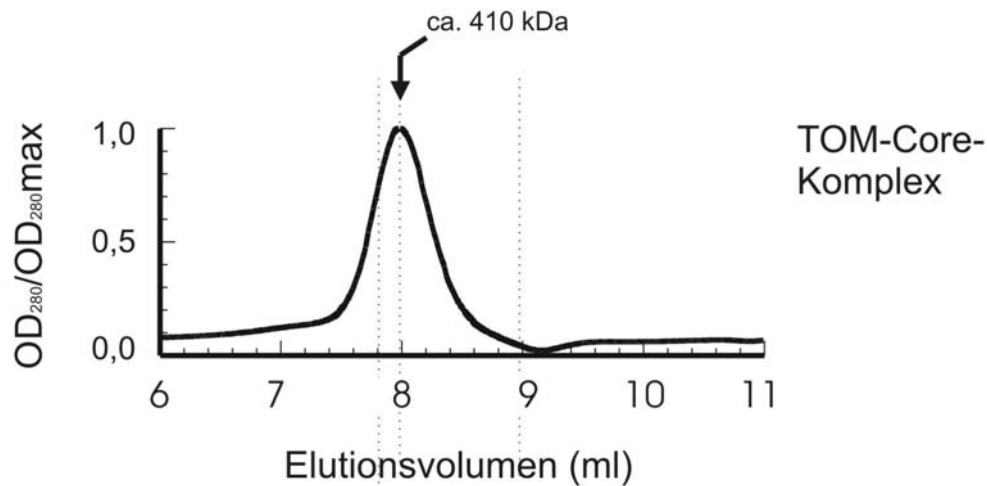


Abbildung 16: Bestimmung der Molekülmasse von TOM-Core-Komplex mittels Gelfiltration

Absorptionskurve eines Gelfiltrationslaufes von 100 μ g isoliertem TOM-Core-Komplex auf einer TSK G4000PW_{XL}-Säule. Die Säule wurde eluiert mit 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glycerin und 0,1 % DDM.

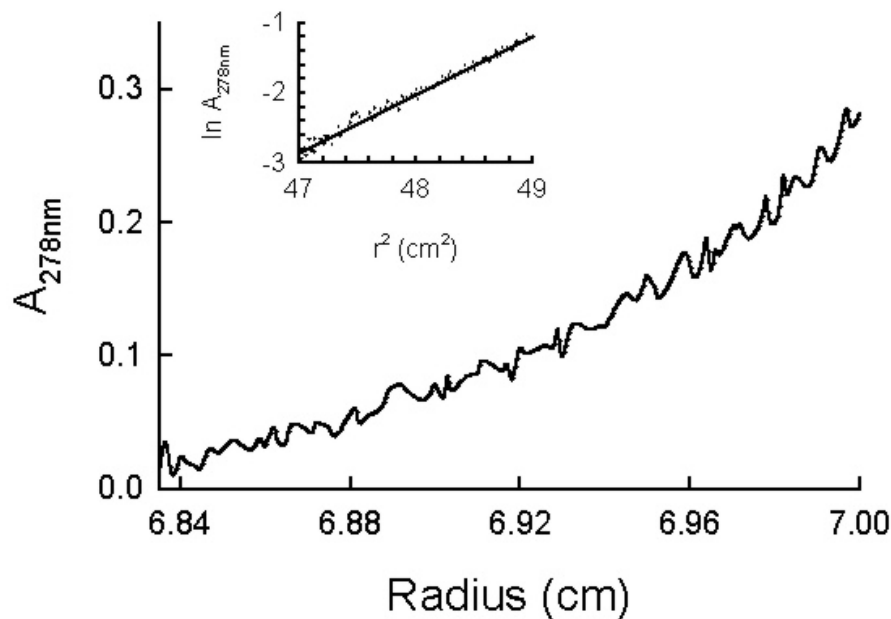


Abbildung 17: Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation von TOM-Core-Komplex

Zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes wurde eine 1,6 mg/ml TOM-Core-Komplex-Lösung in 0,1 % DDM mit Saccharose auf eine Dichte von 1,115 g/ml eingestellt und in einer 4 mm dicken Küvette bei 7800 rpm bei 20 °C über Nacht zentrifugiert. Gemessen wurde die Absorption bei 278 nm als Funktion des Radius. Die Absorption wurde bezüglich der Basislinie ohne Protein korrigiert. In der kleinen Grafik ist $\ln A$ gegen r^2 aufgetragen. Der lineare Korrelationskoeffizient der Ausgleichsgeraden wurde auf 0,99980 optimiert. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt 0,828 1/cm².

Die Molekülmasse von isoliertem TOM-Core-Komplex wurde noch mit einer dritten Methode - mittels analytischer Ultrazentrifugation - bestimmt (Abb.17). Die Zentrifugation wurde im Sedimentationsgleichgewicht unter sog. „gravitational transparency“, d.h. bei gleicher Dichte von Lösung und Detergenzmizellen, durchgeführt. Es wurde eine Molekülmasse von etwa 390 kDa ermittelt.

3.1.5 Die Stöchiometrie der Komponenten des TOM-Core-Komplexes

Um die Stöchiometrie der Komponenten des isolierten TOM-Core-Komplexes zu bestimmen, wurden die einzelnen Komponenten durch Anzucht der Zellen in Vogels Minimalmedium mit ^{35}S -Sulfat radioaktiv markiert. Nach der Isolierung des TOM-Komplexes durch Ni-NTA Affinitätschromatographie wurde die spezifische Radioaktivität der Komplexkomponenten Tom40, Tom22, Tom7 und Tom6 nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel durch Phosphorimageanalyse ermittelt. Dabei wurde der Gehalt an Methionyl- und Cysteoyl-Resten der einzelnen Proteine berücksichtigt (siehe Tabelle 4, 3.Spalte). Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Molare Verhältnisse der Komponenten im TOM-Core-Komplex

Komponente	Methionyl- und Cysteylreste insgesamt (nach dem Gen)	Methionyl- und Cysteylreste im isolierten Protein (nach Sequenzierung)	Stöchiometrisches Verhältnis	Relatives molares Verhältnis
Tom40	11	10	1 (Setzung)	8 (Setzung)
Tom22	4	3	0,55 ($\pm 0,04$)	4,4 ($\pm 0,3$)
Tom6	2	1	0,26 ($\pm 0,08$)	2,0 ($\pm 0,6$)
Tom7	1	1	0,15 ($\pm 0,05$)	1,2 ($\pm 0,4$)

Das relative molare Verhältnis von Tom40, Tom22, Tom6 und Tom7 im isolierten TOM-Core-Komplex wurde als 8 : 4,4 ($\pm 0,3$) : 2,0 ($\pm 0,6$) : 1,2 ($\pm 0,4$) bestimmt (n = 3). Tom40 wurde als Referenz auf 8 Untereinheiten festgesetzt.

Das Molekulargewicht eines Komplexes der ermittelten Zusammensetzung errechnet sich demnach bei den gegebenen Molekulargewichten von Tom40 (38,2 kDa), Tom22 (16,8 kDa), Tom6 (6,5 kDa) und Tom7 (6,0 kDa) auf etwa 392 kDa. Tom5 sollte nicht viel zum Molekulargewicht des TOM-Core-Komplexes beitragen.

3.1.6 Tom40 ist in oligomerer Form an der Struktur des TOM-Komplexes beteiligt

Sind *in vivo* wirklich mehrere Tom40-Komponenten in einem TOM-Komplex vorhanden? Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Hefe-Stamm (UA-TH-32) erzeugt, der sowohl das endogene Tom40 als auch ein Tom40 mit einer aminoterminalen Hexahistidyl-Erweiterung (Tom40_{his6}) exprimiert (siehe 2.1.12.3).

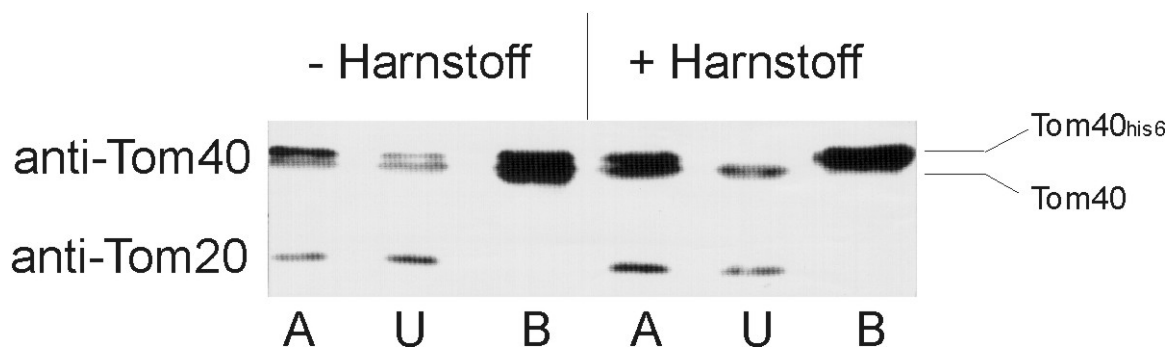


Abbildung 18: Ein TOM-Komplex enthält mehrere Tom40-Moleküle

Der TOM-Komplex wurde aus dem Hefestamm UA-TH-32, der das endogene Tom40 und das Tom40_{his6} exprimiert, in Anwesenheit und in Abwesenheit von 7 M Harnstoff isoliert. A, Auftrag auf die Ni-NTA-Säule; U, ungebundenes Material (Durchlauf); B, gebundenes Material (Elution mit 300 mM Imidazol von der Ni-NTA).

Mitochondrien aus dem Hefestamm UA-TH-32 wurden isoliert. Bei der Isolierung von Tom40 mittels NiNTA-Affinitätschromatographie aus DDM-solubilisierten Mitochondrien wurde ein Tom40-Oligomer isoliert, das sowohl Tom40 als auch Tom40_{his6} enthielt (Abb.18 links). Bei Isolierung in Gegenwart von 7 M Harnstoff konnte nur Tom40_{his6} isoliert werden. Das Oligomer dissoziierte also während der Isolierung (Abb.18 rechts). Das heißt, daß das Hefe-Tom40_{his6} *in vivo* in den TOM-Komplex eingebaut wurde. Im TOM-Komplex sind somit mehrere Tom40-Moleküle enthalten.

3.1.7 Isolierung eines TOM-Core-Komplexes ohne die hydrophilen Domänen von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5

Kann man vom TOM-Core-Komplex noch weitere, strukturell nicht-essentielle Komponenten entfernen, ohne daß der Komplex zerfällt? Um diese Frage zu beantworten, wurde der TOM-Core-Komplex einer partiellen Proteolyse unterworfen.

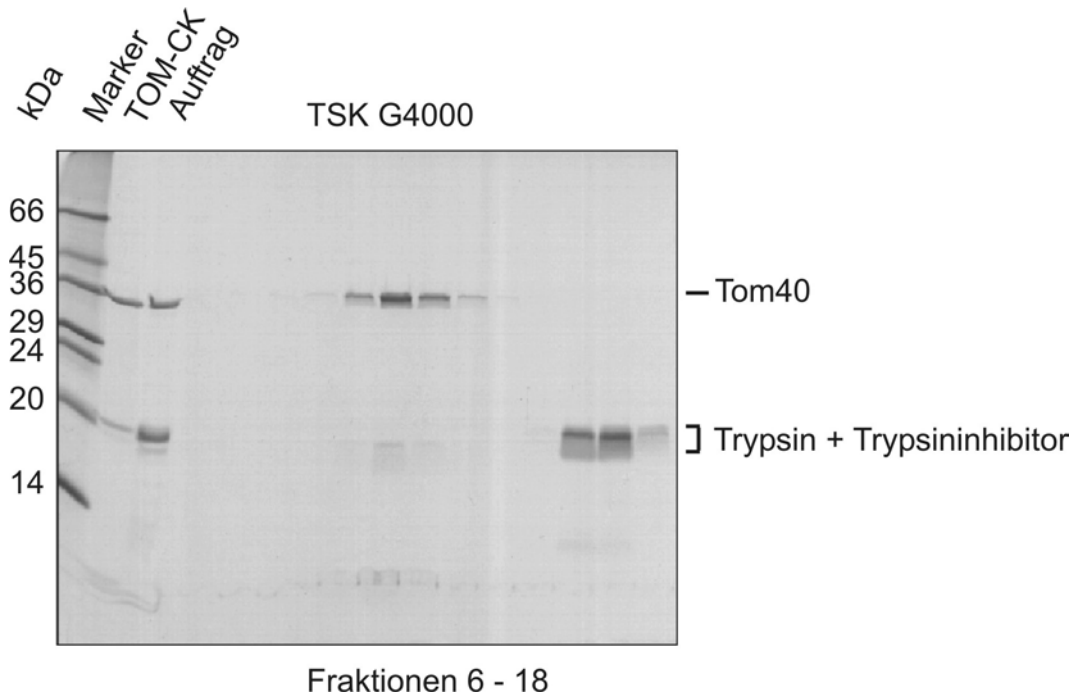


Abbildung 19: Trypsinierter TOM-Core-Komplex

Limitierte Proteolyse von 100 µg gereinigtem TOM-Core-Komplex (TOM-CK) durch Inkubation mit 100 µg/ml Trypsin für 15 min bei 4°C. Nach Zugabe der 20fachen Menge an Trypsininhibitor wurden die Proteine über eine TSK G4000PWXL-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Bei den Banden unter den Tom40-Banden handelt es sich um Fragmente von Tom22 (Nachweis über Immunoblotting).

Dazu wurde gereinigter TOM-Core-Komplex kurz mit Trypsin inkubiert. Trypsin und Trypsininhibitor wurden nachfolgend über eine TSK G4000PW_{XL}-Gelfiltrationssäule abgetrennt (Abb.19). Das Elutionsverhalten des trypsinierten Komplexes unterschied sich nicht wesentlich von unter gleichen Bedingungen analysiertem TOM-Core-Komplex: Die apparente Molekülmasse des trypsinisierten TOM-Core-Komplexes lag zwischen 350 und 400 kDa. Mit Hilfe von Immundekoration konnten weder Tom6 noch

Tom7 in den Tom40 enthaltenden Fraktionen nachgewiesen werden. Auch Tom22 war nur in Fragmenten nachweisbar. In Coomassie-gefärbten Gelen war keine Tom5-Bande zu sehen.

Es war also möglich, eine Form des TOM-Komplexes herzustellen, der nur Tom40 und die hydrophoben Regionen von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 enthielt.

3.2 Isolierung und Charakterisierung von Tom40

In Kapitel 3.1.5 deuteten bereits die Untersuchungen zur Stöchiometrie darauf hin, daß Tom40 mit 8 Untereinheiten die Hauptkomponente des TOM-Core-Komplexes ist. Es wurde gezeigt, daß Tom40 zusammen mit den Transmembrandomänen von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 einen hocholigomeren Komplex bildet. Um die strukturelle Rolle dieser Transmembrandomänen und die zentrale Funktion von Tom40 weiter zu untersuchen, wurde auf zwei verschiedene Arten Tom40 allein isoliert: Zum einen durch weitere Dissoziation des TOM-Core-Komplexes und zum anderen durch Isolierung eines Tom40 aus *Neurospora crassa*, das eine aminoterminal Hexahistidyl-Erweiterung trug.

3.2.1 Zerlegung des TOM-Core-Komplexes

Um Tom40 allein zu isolieren, wurde der TOM-Core-Komplex durch Inkubation bei hohen Detergenskonzentrationen weiter zerlegt.

Zunächst wurde die Zerlegung bei Detergenskonzentrationen bis zu 2 % Triton X-100, 2 % DDM und 5 % Octylglycosid bei Proteinkonzentrationen von 5 mg/ml versucht. Die Inkubation erfolgte jeweils für 30 min in 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glycerin und dem entsprechenden Detergens. Das Ergebnis wurde mittels blauer Nativgelelektrophorese analysiert. Triton und DDM zeigten wenig Effekt. Die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen an Octylglycosid führten jedoch bei Konzentrationen von mehr als 2 % zur Zerlegung des TOM-Core-Komplexes in kleinere Subkomplexe (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich waren die

relativ kurzen Alkylketten von Octylglycosid in der Lage, hydrophobe Protein-Protein Wechselwirkungen im TOM-Core-Complex aufzubrechen.

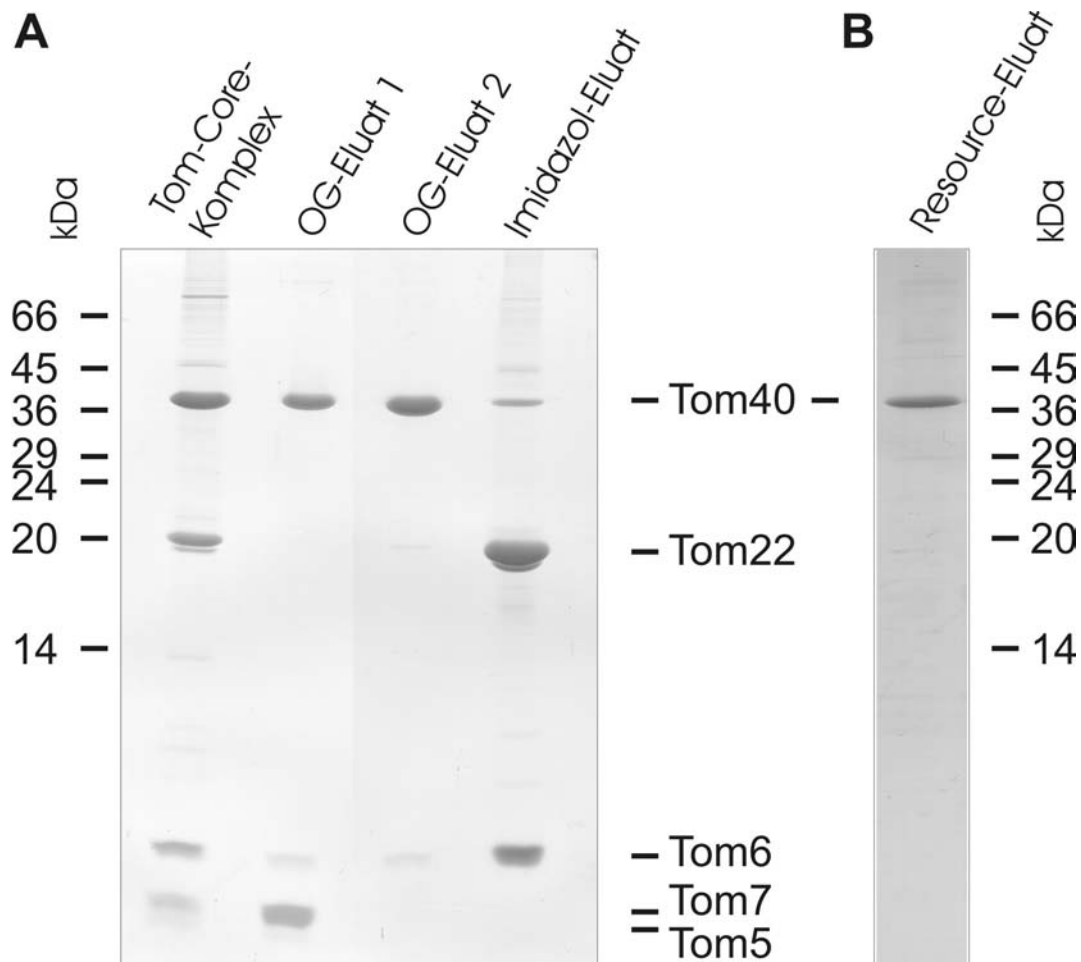


Abbildung 20: Zerlegung des TOM-Core-Komplexes

A: High-Tris-Harnstoff-Gel nach Zerlegung von TOM-Core-Komplex auf einer Ni-NTA-Affinitätssäule. Isolierter TOM-Core-Komplex war das Ausgangsmaterial der Zerlegung. Tom40 mit Tom7, Tom5 und wenig Tom6 wurde nach nach einem Säulenvolumen Zerlegungspuffer A (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 3 % Octylglycosid) eluiert (OG-Eluat 1). Nach drei Säulenvolumen Zerlegungspuffer A wurde nur noch Tom40 mit wenig Tom6 eluiert (OG-Eluat 2). Tom22 und Tom6 wurden mit Zerlegungspuffer B (50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 1 % Octylglycosid; 30 mM Imidazol) eluiert (Imidazol-Eluat). B: High-Tris-Harnstoff-Gel des stabilisierten Tom40-Komplexes. Resource-Eluat, Hauptfraktion des Eluats von der ResourceQ-Säule, auf die OG-Eluat 1 und OG-Eluat 2 geladen worden waren, um dann mittels eines Salzgradienten von 0-1 M KCl in 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glyzerin, 0,5 % DDM eluiert zu werden. Das Tom40 eluierte bei ca. 250 mM KCl.

Auf Grundlage dieses Ergebnisses, wurde eine Methode entwickelt, Tom40 zu isolieren. Zunächst wurde gereinigter TOM-Core-Komplex über das vorhandene Tom22_{his6} im Komplex an Ni-NTA gebunden. Nachfolgend wurde der so gebundene Komplex auf der Säule mit 3 % Octylglycosid zerlegt und

nicht gebundene Teilkomplexe von der Säule eluiert. Tom22_{his6}-enthaltende Teilkomplexe, die an die Säule gebunden blieben, wurden nachfolgend mit Imidazol eluiert. Abb.20A zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Die Zerlegung resultierte in drei Teilfraktionen. Die erste Octylglycosid-Teilfraktion enthielt Tom40 zusammen mit Tom7, Tom5 und sehr wenig Tom6. Die zweite Teilfraktion enthielt nur noch Tom40 und sehr wenig Tom6. Die dritte Teilfraktion, das Eluat mit Imidazolpuffer, enthielt Tom22 und Tom6 sowie geringe Mengen von Tom40, das offenbar nicht vollständig von Tom22_{his6} abdissoziiert war.

Um Aggregation von isoliertem Tom40 zu vermeiden, mußte es durch Detergensaustausch stabilisiert werden. Das konnte durch einen Saccharosedichtegradientenlauf in 0,5 % DDM erreicht werden. Stabilisierung konnte auch durch Bindung an Anionenaustauschmaterial (ResourceQ) mit anschließender Hochsalzelution bei 0,5 % DDM erreicht werden. Letztere Stabilisierungsmethode hatte den Vorteil der größeren Schnelligkeit bei gleichzeitiger Möglichkeit die Probe aufzukonzentrieren und den Anteil von Tom7 und Tom5 in der Tom40-Fraktion unter die Nachweisgrenze zu reduzieren (Abb.20B). Das ResourceQ-Eluat enthielt somit weitgehend nur Tom40.

3.2.2 Tom40 bildet oligomere Komplexe

Analog der Molekülmassenbestimmung des TOM-Core-Komplexes wurde isoliertes Tom40 mittels Blau-Nativgelelektrophorese analysiert. Tom40 wurde anschließend durch Western-Blotting und Dekoration mit Antikörpern gegen Tom40 nachgewiesen. Wie in Abb.21A zu sehen, wurde eine Leiter von Tom40-Oligomeren beobachtet, die aufgrund ihrer apparenten Molekülmassen als Dimere, Tetramere, Hexamere und Octamere von Tom40 interpretiert werden können. Die Leiter von Tom40-Banden muß nicht zwangsläufig eine Heterogenität des isolierten Tom40-Komplexes bedeuten, sondern kann ihre Ursache in den Bedingungen der Blau-Nativ-Gelelektrophorese haben. Schon bei der Zerlegung des TOM-Core-Komplexes wurden oligomere Formen von Tom40 im Blau-Nativgel nach

Immunodekoration beobachtet (Daten nicht gezeigt). Wie bereits beschrieben, tendierten die verschiedenen TOM-Komplexe unter den Bedingungen der Blau-Nativ-Gelelektrophorese zur Dissoziation: Der TOM-Holo-Komplex verliert Tom70 und Tom20. Analyse des stabilisierten Tom22 aus der Zerlegung des TOM-Core-Komplexes mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese zeigte, daß es nur eine monomere Form bildet (Abb.21B).

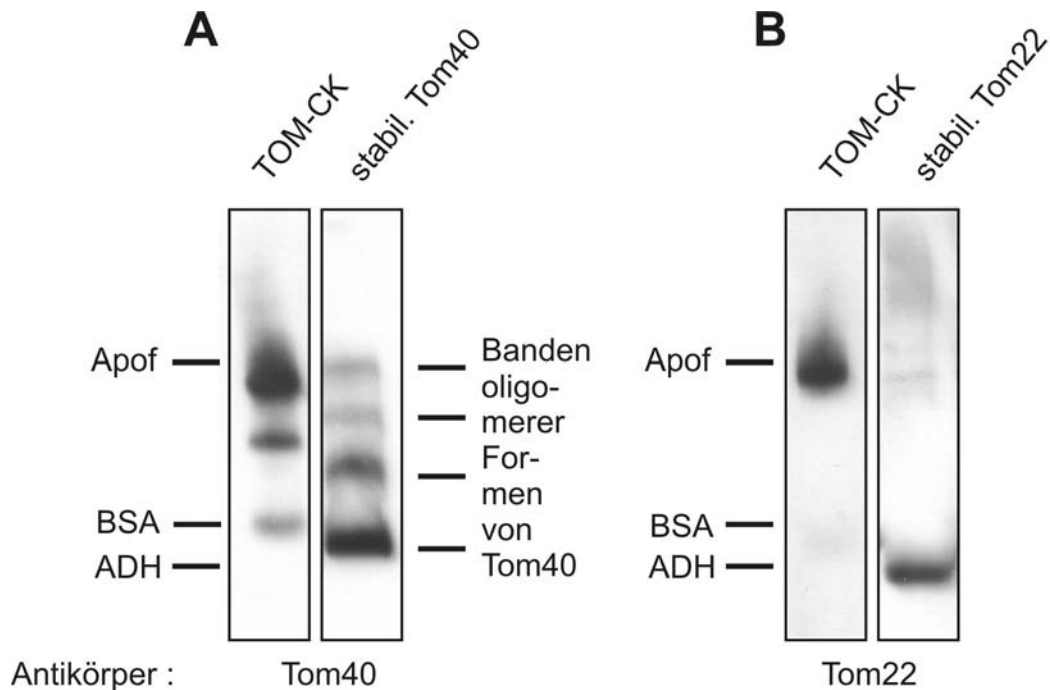


Abbildung 21: Blaue Nativgelelektrophorese von isoliertem Tom40- und Tom22-Komplex

Westernblot eines blauen Nativgels. Die Antikörper, mit denen dekoriert wurde, sind unten angezeigt. die Markerproteine waren ADH, Hefealkoholdehydrogenase (50 kDa), BSA, Rinderserumalbumin (66 kDa) und Apof, Pferd milzapoferritin (443 kDa)). (A) TOM-Core-Komplex (TOM-CK) und über einen Saccharosedichtegradienten stabilisiertes Tom40 (Stabil. Tom40). (B) TOM-Core-Komplex (TOM-CK) und über einen Saccharosedichtegradienten stabilisiertes Tom22 (stabil. Tom22), das allerdings noch Tom40 enthielt. Die in (A) rechts markierten Banden entsprechen wahrscheinlich dem Tom40-Dimer (unterste Bande), dem Tetramer, dem Hexamer und dem Oktamer von Tom40.

Wurde Tom40 einer Gelfiltrationsanalyse unterzogen, eluierte es in einer breiten Bande, deren Maximum bei einer Molekülmasse zwischen 350 und 450 kDa lag (Abb.22). Offenbar bildet auch isoliertes Tom40 hocholigomere Komplexe.

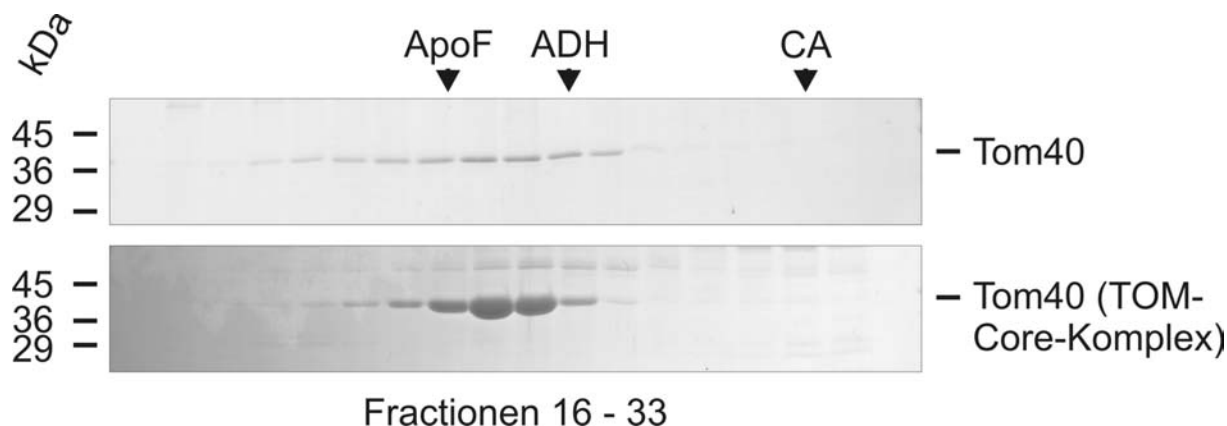


Abbildung 22: Gelfiltration von Tom40

Oben: Gelfiltrationsanalyse von Tom40 und – zum Vergleich – TOM-Core-Komplex in DDM. Die Pfeile geben die Position der Markerproteine an (ApoFerritin 443 kDa; Alkoholdehydrogenase 150 kDa; Carboanhydrase 29 kDa). Unten: Gelfiltrationsanalyse von Tom40-Core-Komplex zum Verleich. Puffer jeweils: 50 mM Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glycerin, 0,1 % DDM.

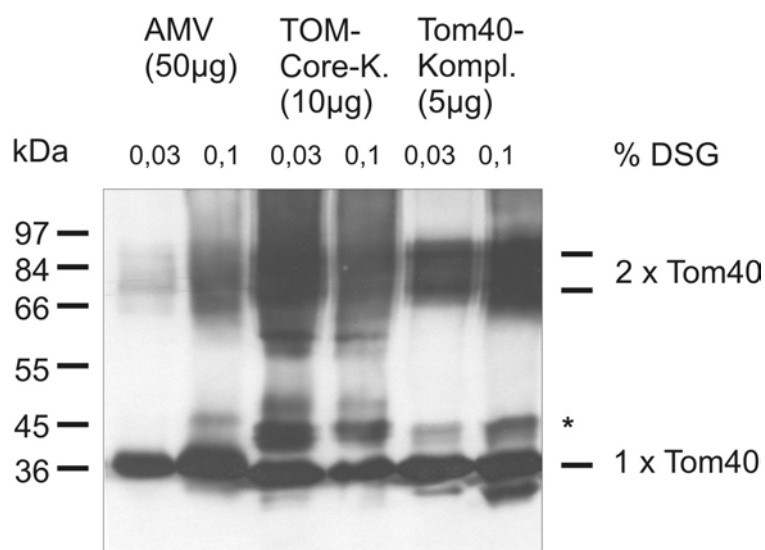


Abbildung 23: Chemische Quervernetzung von Proteinen in Außenmembranvesikeln, im TOM-Core-Komplex und isoliertem Tom40

Zur chemischen Quervernetzung wurden die Proben jeweils 30 min bei 25°C mit den angegebenen Konzentrationen des Crosslinkers Disuccinimidylglutarat (DSG) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 M Glycin gestoppt und die Proteine wurden mit TCA gefällt. Der Westernblot des 10/0,2 %igen SDS–PAGE-Gels wurde mit Anti-Tom40-Antikörpern dekoriert. AMV, Außenmembranvesikel. Die Molekulargewichtsmarker sind links angezeigt.

Durch chemische Quervernetzung von Proteinen in Außenmembranvesikeln konnte in vergangenen Studien gezeigt werden, daß Tom40 in Dimeren strukturiert zu sein scheint (Rapaport *et al.*, 1998a). Gleiches scheint für Tom40 in isoliertem Tom-Core-Komplex und für isoliertes Tom40 zu gelten (Abb.23).

3.2.3 Isolierung von Hexahistidyl-Tom40 aus *Neurospora crassa*

Ein weiterer Ansatz, Tom40 aus *Neurospora crassa* zu isolieren, war die Isolation von Tom40 aus dem *Neurospora crassa*-Stamm U3-2-III, der eine Version von Tom40 mit einer aminoterminalen Hexahistidyl-Erweiterung exprimiert. Dadurch sollte geprüft werden, ob Tom40_{his6} als Tom40-Komplex funktionell ist. Zum anderen sollte auf alternativem Weg ein Tom40-Komplex gereinigt werden, der frei von anderen Tom-Komponenten war.

Tom40_{his6} wurde aus in Triton X-100 solubilisierten Außenmembranvesikeln des *Neurospora crassa*-Stammes U3-2-III, über Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und über eine Superose6-Gelfiltrationssäule (Abb.24) nachgereinigt. Überraschenderweise eluierte Tom40_{his6} von der Gelfiltrationssäule in einer breiten Bande mit einem Maximum bei 200 kDa. Das Tom40_{his6} bildete offenbar niedermolekulare Strukturen als das durch Dissoziation des TOM-Core-Komplexes gewonnene Tom40. Immunodekoration zeigte, daß die Tom40_{his6} enthaltenden Fraktionen kein Porin und kein natives Tom40 enthielten. Aus 20 mg Außenmembranvesikeln konnten ca. 30-50 µg Tom40_{his6} gewonnen werden. Aufgrund dieser geringen Ausbeuten wurde Tom40_{his6} nur für elektrophysiologische Versuche eingesetzt, da diese nur geringe Mengen an Protein erforderten.

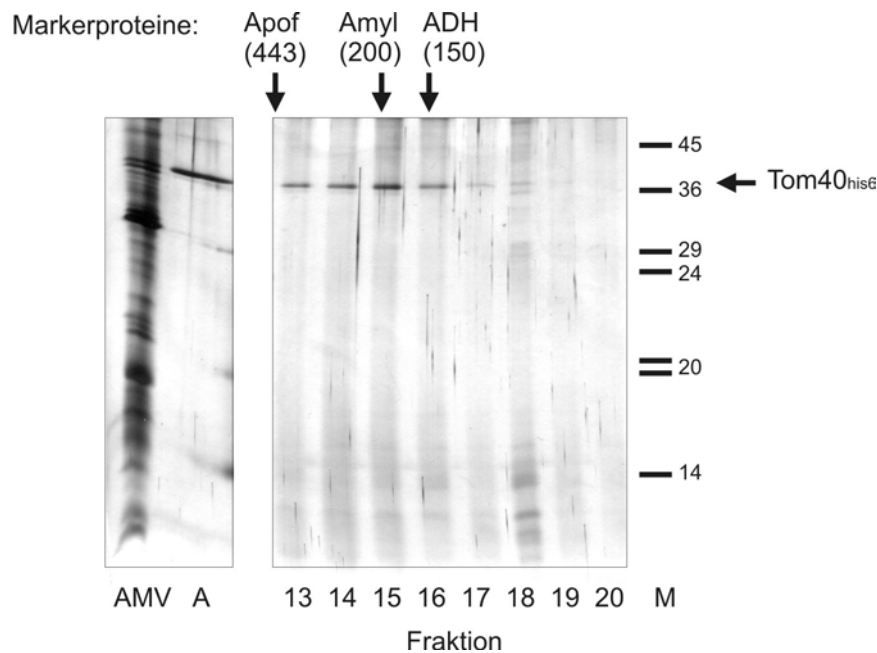


Abbildung 24: Gelfiltration von gereinigtem Tom40_{his6} aus dem *Neurospora crassa*-Stamm U3-2-III

50 µg des aus dem *Neurospora crassa*-Stamm isolierten Tom40_{his6} wurden über eine Superose6-Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Gezeigt ist ein silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel mit dem Auftrag und den Fraktionen der Säule. AMV, Außenmembranvesikel; A, Auftrag auf die Superose-Säule; 13-20: Fraktionen des Säulenlaufs; M, Marker. Molekulargewichtsmarker für die Gelfiltration: Apof, Apoferritin; Amyl, Amylase; ADH, Alkoholdehydrogenase (in Klammern das Molekulargewicht dieser Proteine in kDa).

3.3 Funktionelle Charakterisierung der verschiedenen Formen des TOM-Komplexes

Nachdem die unterschiedlichen Verfahren zur Isolierung und Reinigung verschiedener TOM-Subkomplexe etabliert worden waren, war es wichtig, die Funktionsfähigkeit der verschiedenen Formen des TOM-Komplexes zu zeigen. Im Folgenden werden Versuche zur Bindung von Vorstufenproteinen und elektrophysiologische Experimente mit diesen Komplexen dargelegt.

3.3.1 Bindung mitochondrialer Vorstufenproteine an isolierten TOM-Core-Komplex

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob der TOM-Core-Komplex in der Lage ist, mitochondriale Vorstufenproteine zu erkennen und zu binden. Als Vorstufenprotein wurde Su9(1-69)-DHFR_{His6} eingesetzt. Su9(1-69)-DHFR_{His6}

ist ein typisches mitochondriales Modellvorstufenprotein, das aus der 69 Aminoacylreste langen Präsequenz der Untereinheit 9 der F_0F_1 -ATPase von *Neurospora crassa* und der Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus *Mus musculus* besteht. Es trägt einen Hexahistidylrest, wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Als Kontrollproteine wurden DHFR_{His6} und RCMLA verwendet. RCMLA ist Lactalbumin, das durch chemische Reduktion und Carboxylethylierung in nicht-nativer, ungefalteter Form vorliegt.

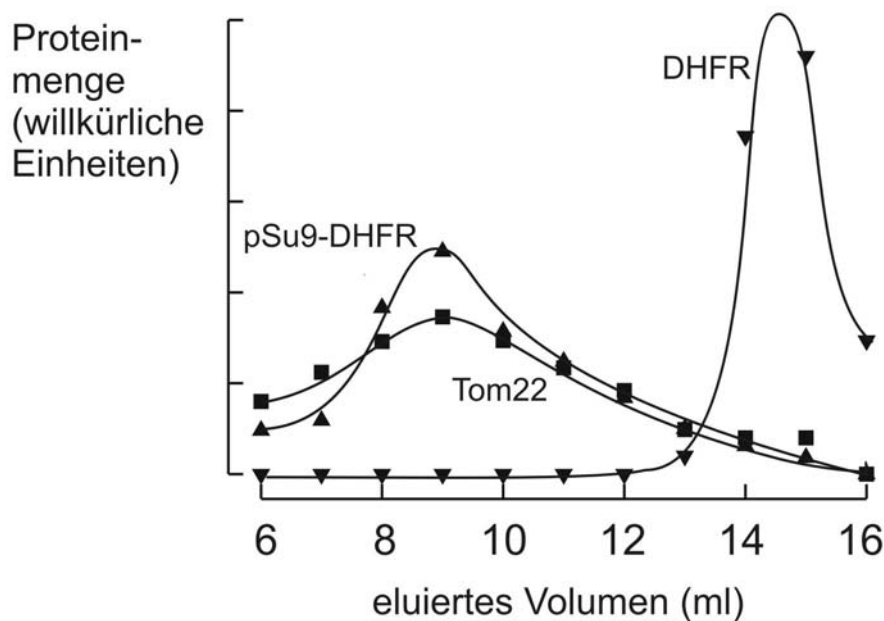


Abbildung 25: Bindung von Su9(1-69)-DHFR_{His6} an TOM-Core-Komplex in Außenmembranvesikeln

Su9(1-69)-DHFR_{His6} wurde an Außenmembranvesikel gebunden und diese mit 1 % DDM solubilisiert. Anschließend wurde das Gemisch auf einer mit Kaliumacetat pH 7,0, 10 mM MOPS, 10 % Glycerin 0,1 % DDM vorequilierten TSK G-4000PW_{XL}-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die Proteine in den Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet, und mit Antikörpern gegen Tom22 und DHFR dekoriert. Die Banden auf dem Film wurden densitometrisch quantifiziert.

Gereinigtes Su9(1-69)-DHFR_{His6} wurde mit isolierten Außenmembranvesikeln für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach anschließender Zugabe von DDM (Endkonzentration 1 %) wurden die Proteine des Ansatzes über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt (Abb.25). Su9(1-69)-DHFR_{His6} koeluierte mit Tom22 und Tom40, wohingegen das DHFR_{His6} ohne Su9-Präsequenz viel später als der Komplex eluierte. Unter den beschriebenen Versuchsbedin-

gungen wurde also Su9(1-69)-DHFR_{His6} präsequenzabhängig vom TOM-Core-Komplex in Außenmembranvesikeln erkannt und gebunden, DHFR_{His6} nicht.

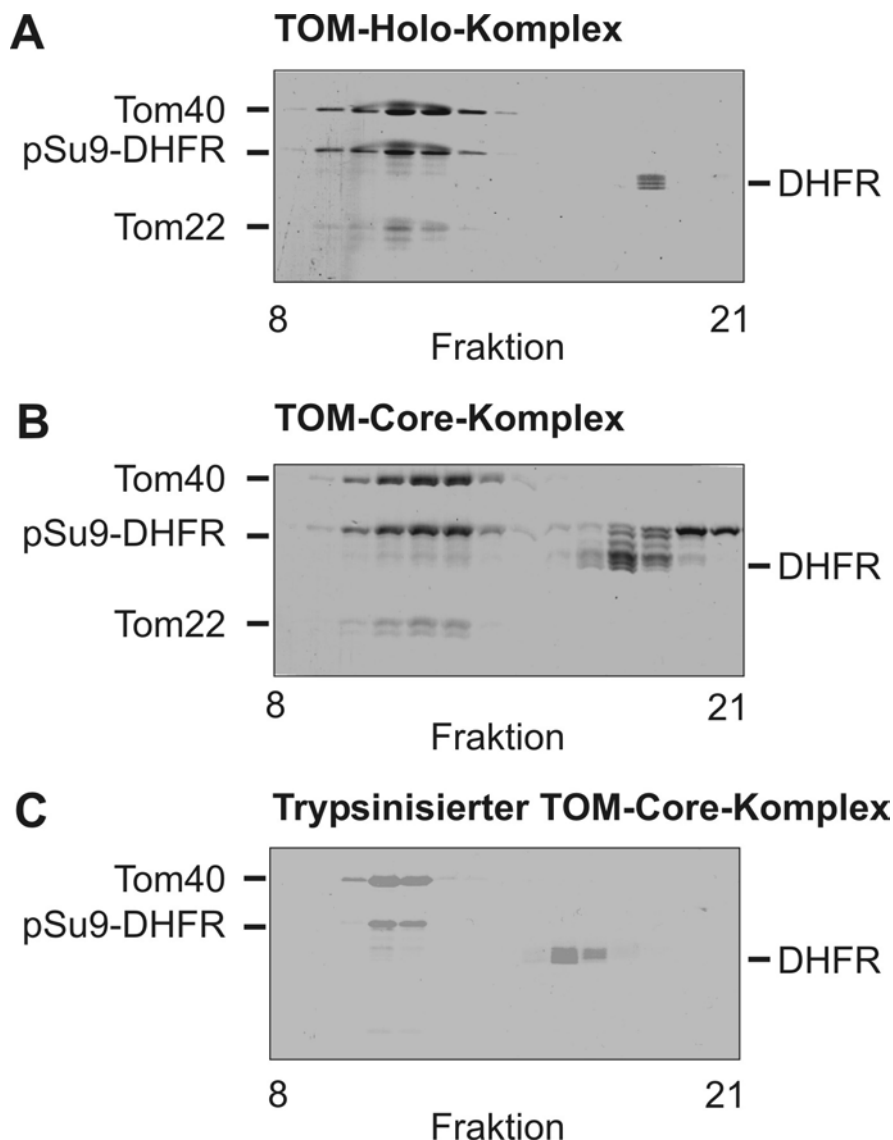


Abbildung 26: Bindung eines mitochondrialen Vorstufenproteins an gereinigten TOM-Holo-Komplex, TOM-Core-Komplex und trypsinisierten TOM-Core-Komplex

Gezeigt sind Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele der Elutionsfraktionen der Gelfiltrationsläufe nach Inkubation der verschiedenen Komplexe mit Su9(1-69)-DHFR_{His6} für 30 min bei 4°C.

84 µg TOM-Core-Komplex wurden mit 202 µg Su9(1-69)-DHFR_{His6} (A), 122 µg TOM-Holo-Komplex mit 245 µg Su9(1-69)-DHFR_{His6} (B) und 30 µg trypsinisierter TOM-Core-Komplex mit 60 µg Su9-DHFR_{His6} (C) inkubiert und über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen werden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Am Rand sind die aufgetrennten Proteinkomponenten angezeigt.

Ein unter analogen Bedingungen durchgeführtes Experiment mit tryptisinisiertem TOM-Core-Komplex, der neben Tom40 nur noch die in die Membran integrierten Teile von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 enthielt, ergab das gleiche Ergebnis. Auch tryptisinierter TOM-Core-Komplex war in der Lage, mitochondriale Vorstufenproteine zu binden (Abb.26C).

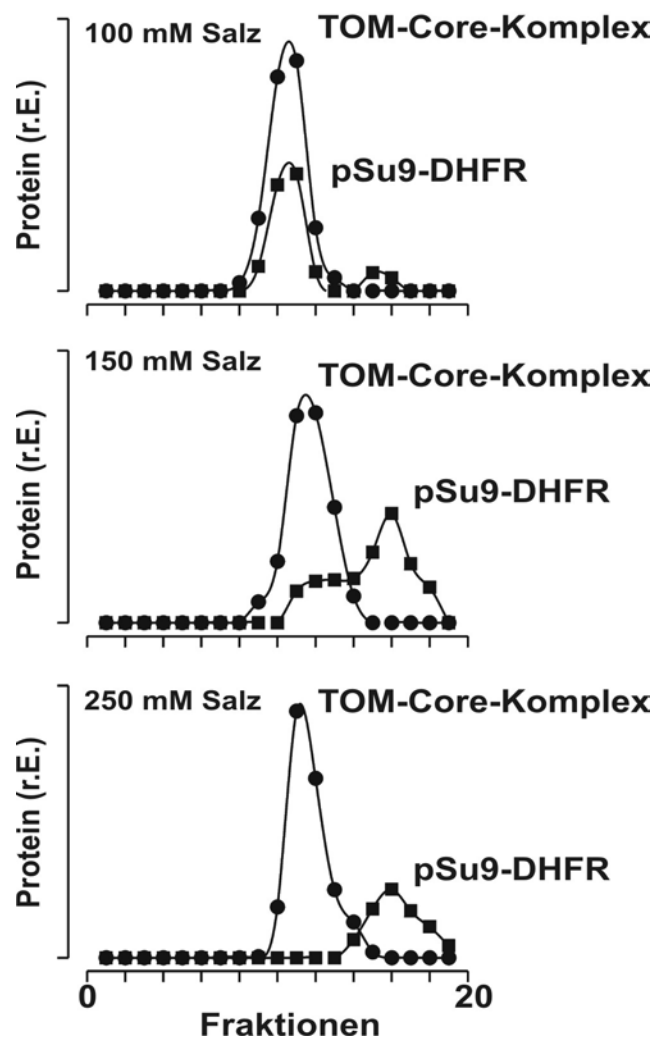


Abbildung 27: Bindung eines Vorstufenproteinen an den TOM-Core-Komplex in Abhängigkeit der Salzkonzentration

30 μ g TOM-Core-Komplex wurden zusammen mit 30 μ g Su9(1-69)-DHFR_{His6} mit verschiedenen Salzkonzentrationen (50 mM Kalimacetat plus 50 mM, 100 mM oder 200 mM KCl) inkubiert und die Proteine der Probe anschließend mittels Gelfiltration aufgetrennt. Aufgetragen sind die aus SDS-PAGE-Gelen densitometrisch bestimmten Mengen an Protein der einzelnen Fraktionen. r.E., relative Einheiten.

Entsprechende Bindungsversuche mit anschließender Auftrennung der Proteine mit Hilfe von Saccharosedichtegradienten zeigten gleiche Ergeb-

nisse (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich waren Erkennung und Bindung von Vorstufenproteinen mit aminoterminalen Signalsequenzen nicht abhängig von der Präsenz hydrophiler cytosolischer oder zum Intermembranraum exponierter Domänen von Tom22, Tom20 oder Tom70.

Frühere Studien zur Bindung von Vorstufenproteinen an Mitochondrien und mitochondriale Außenmembranvesikel ergaben eine Salzabhängigkeit der Bindung (Mayer *et al.*, 1993, Mayer *et al.*, 1995). Daraus wurde die Existenz unterschiedlich affiner Bindungsstellen für mitochondriale Vorstufenproteine abgeleitet.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von Vorstufenprotein an den isolierten TOM-Core-Komplex ebenfalls salzabhängig ist, wurden Bindungsversuche mit diesem und Su9(1-69)-DHFR_{His6} bei verschiedenen Ionenstärken (50 mM, 100 mM und 200 mM Kaliumchlorid) durchgeführt (Abb.27). In der Tat erwies sich die Bindung von Su9(1-69)-DHFR_{His6} an den TOM-Core-Komplex als salzabhängig. Während Su9(1-69)-DHFR_{His6} bei 100 mM Salz (50 mM Kaliumacetat + 50 mM KCl) noch vollständig an den gereinigten TOM-Core-Komplex band, band es bei 150 mM Salz nur noch teilweise und bei 250 mM Salz nicht mehr an gereinigten TOM-Core-Komplex. Der isolierte TOM-Core-Komplex hatte somit die gleichen Charakteristika wie der Komplex in mitochondrialen Außenmembranvesikeln.

Zur Ermittlung der Stöchiometrie der Bindung von Su9(1-69)-DHFR_{His6} an gereinigten TOM-Core-Komplex wurde die Menge an gebundenem zu insgesamt eingesetztem Su9-DHFR_{His6} in Bindungsexperimenten unter Konstanthaltung der TOM-Core-Komplexkonzentration und Variation der Su9(1-69)-DHFR_{His6}-Konzentration bestimmt. Dazu wurde gereinigter TOM-Core-Komplex mit unterschiedlichen Mengen an Su9(1-69)-DHFR_{His6} inkubiert.

Wie in Abb.28 zu sehen, näherte sich die Kurve mit steigender Konzentration an Vorstufenprotein asymptotisch einem Sättigungswert von gebundenen Su9-DHFR_{His6}-Molekülen pro TOM-Core-Komplex an. Demnach können *in vitro* ca. 8-9 Su9-DHFR_{His6}-Moleküle pro TOM-Core-Komplex binden. Der aufgereinigte TOM-Core-Komplex sollte also 8-9 Bindungsstellen für Su9-DHFR_{His6} aufweisen.

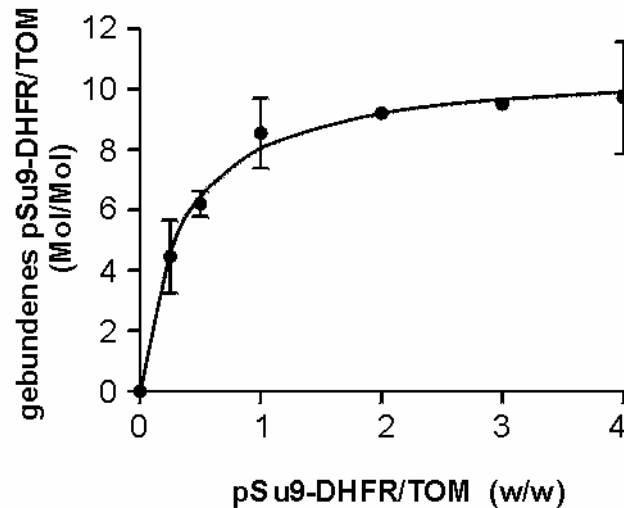


Abbildung 28: Titration der Bindungsstellen für Vorstufenproteine am TOM-Core-Komplex

30 μ g gereinigter TOM-Core-Komplex (740 nMol) wurden mit zunehmenden Mengen an Su9(1-69)-DHFR_{His6} inkubiert und die Proteine der Probe anschließend über Gelfiltration aufgetrennt. Die Menge an TOM-Core-Komplex und gebundenem Su9(1-69)-DHFR_{His6} in den Elutionsfraktionen wurde in Coomassie-gefärbten Gelen densitometrisch mit Hilfe auf demselben Gel aufgetragenen Standardmengen von TOM-Core-Komplex und Su9-DHFR_{His6} ermittelt. Um das molare Verhältnis zwischen Substrat und TOM-Core-Komplex zu bestimmen wurde von 410 kDa für den TOM-Core-Komplex und 25,6 kDa für Su9(1-69)-DHFR_{His6} ausgegangen.

3.3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen zum TOM-Core-Komplex, trypsinisierten TOM-Core-Komplex und Tom40

Frühere Untersuchungen deuteten darauf hin, daß Vorstufenproteine durch hydrophile Poren über die Außenmembran transloziert werden (Pfaller *et al.*, 1988). Die generelle Importpore (GIP) wurde im TOM-Komplex vermutet (Kiebler *et al.*, 1990). Mit isoliertem TOM-Holo-Komplex wurde gezeigt, daß er in Lipiddoppelmembranen Kanäle bilden kann (Künkele *et al.*, 1998a). Da die Frage, welche Komponenten für die Bildung des Translokationskanals in *Neurospora crassa* notwendig sind, bisher nicht beantwortet wurde, wurden im Folgenden verschiedene Formen des TOM-Komplexes in elektrophysiologischen Untersuchungen verglichen. Im Einzelnen wurden der TOM-Core-Komplex, trypsinisierter TOM-Core-Komplex und isoliertes Tom40 elektrophysiologisch charakterisiert.

3.3.2.1 Kanaleigenschaften von TOM-Core-Komplex, trypsinisierter TOM-Core-Komplex und Tom40

Mit isoliertem TOM-Core-Komplex, trypsinisiertem TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und isoliertem Tom40_{his6} von *Neurospora crassa* wurden Mehrkanalmessungen bei einer Elektrolytkonzentration von 1 M KCl durchgeführt. Abb.29 zeigt die Zunahme der Membranleitfähigkeit sog. „schwarzer Lipidmembranen“ infolge von Insertionsereignissen von TOM-Core-Komplex, trypsinisiertem TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und isoliertem Tom40_{his6} als Funktion der Zeit. Die Höhe der einzelnen Leitfähigkeitszunahmen wurde statistisch ausgewertet. Die mittlere Leitfähigkeit lag bei allen Kanälen zwischen 2 und 3 nS (Tabelle 5). Die Messung der Ionenselektivität von Tom40-Kanälen ergab ein Verhältnis der Permeabilitäten von Kationen zu Anionen P_c/P_a von 3,0 (Daten nicht gezeigt), nahezu die gleiche Ionenselektivität, wie sie für den TOM-Holo-Komplex ermittelt wurde (Künkele *et al.*, 1998a). Dies spricht dafür, daß die Kanäle jeweils von gleichen Strukturen gebildet werden.

Tabelle 5: Mehrkanalmessungen an TOM-Komplexen und Porin

	Anzahl der vermessenen Kanäle	Mittlere Leitfähigkeit bei 1M KCl (nS)	Ionenselek- tivität (P_c/P_a)
TOM-Holo-Komplex	182	2,3	3,0 ⁷
TOM-Core-Komplex	84	2,3	kationens. ⁸
Trypsinisierte TOM-Kernkompl.	202	2,7	n.d.
Tom40-Komplex	114	2,8	3,0
Tom40 _{his6}	141	2,7	n.d.
Mitochondriales Porin	93	4,0	0,4 ⁹

⁷ Nach Künkele *et al.*, 1998b.

⁸ kationens., kationenselektiv. Die Messung konnte nicht quantitativ ausgewertet werden.

⁹ Nach Freitag *et al.*, 1983.

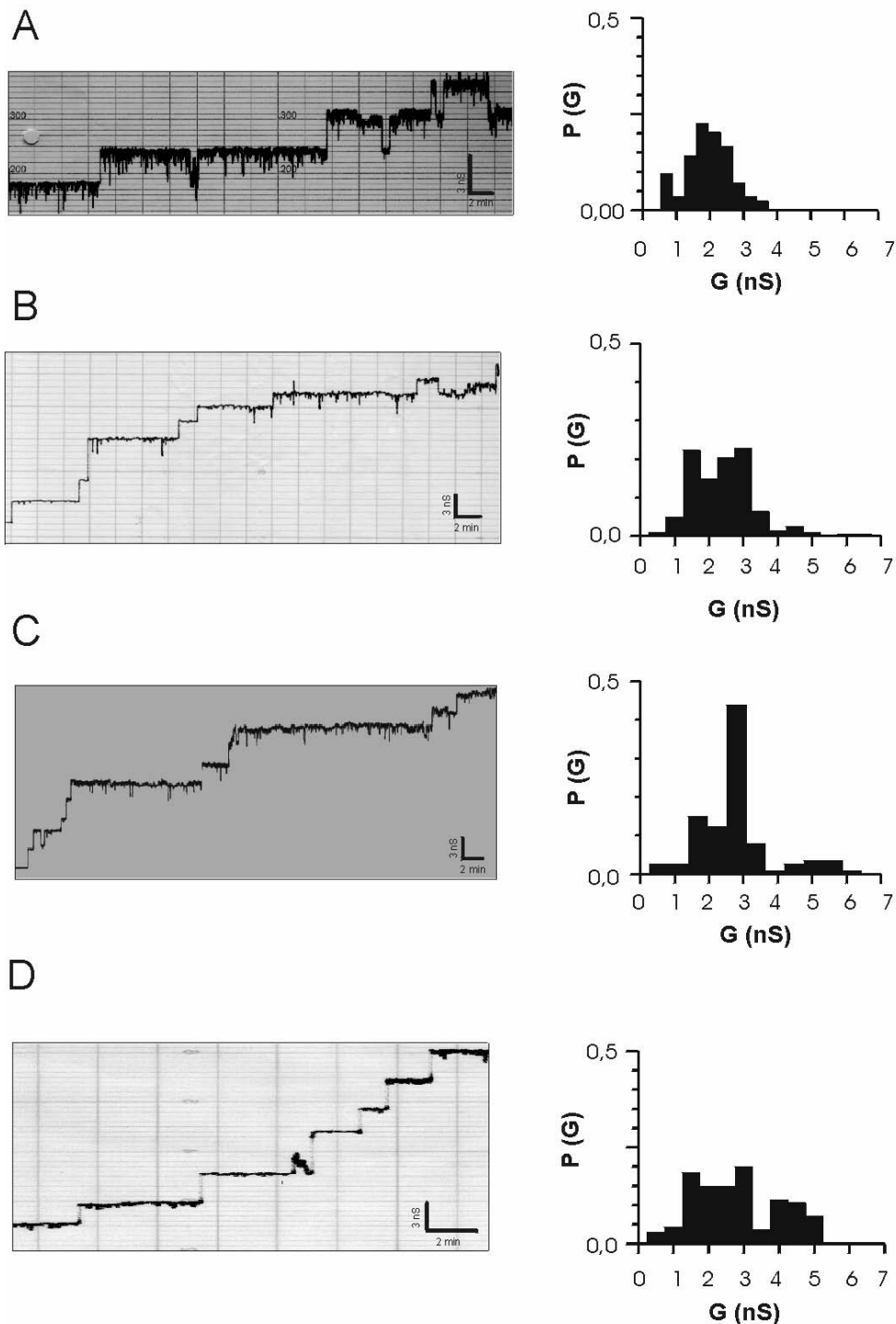


Abbildung 29: Mehrkanalmessungen an TOM-Core-Komplex, trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex

G/t-Diagramm und dazugehöriges Histogramm der Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Leitfähigkeitsanstiege infolge von Insertionsereignissen in eine Lipidmembran von (A) TOM-Core-Komplexen ($n = 84$), (B) trypsinisierten TOM-Core-Komplexen ($n = 202$), (C) Tom40-Komplexen ($n = 114$) und (D) isoliertem Tom40_{his6} ($n = 141$). Die Messungen wurden jeweils bei 1 M KCl, 10 mM Hepes, pH 7,0 und einem Membranpotential von 20 mV durchgeführt. G, Leitfähigkeit; P(G), relative Häufigkeit des Leitfähigkeitsanstiegs.

Da alle vier untersuchten Formen des TOM-Komplexes ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften zum TOM-Holo-Komplex aufwiesen, ist davon auszugehen, daß die gemessenen Kanäle die gleiche Struktur aufweisen. In Kontrollexperimenten eingesetztes mitochondriales Porin zeigte hingegen ganz andere elektrophysiologische Eigenschaften als der TOM-Holo-Komplex und die anderen Formen des TOM-Komplexes (Freitag *et al.*, 1983).

Zur Ermittlung des Schließungsverhaltens der von den verschiedenen TOM-Komplexen gebildeten Kanäle, wurden Messungen an Einzelkanälen von Michel Thieffry im Laboratoire de Neurobiologie, Cellulaire et Moléculaire du CNRS durchgeführt. Die Messungen wurden an mit Lipiddoppelmembranen fusionierten Lipidvesikeln, in die TOM-Core-Komplex oder Tom40-Komplex rekonstituiert war, vorgenommen.

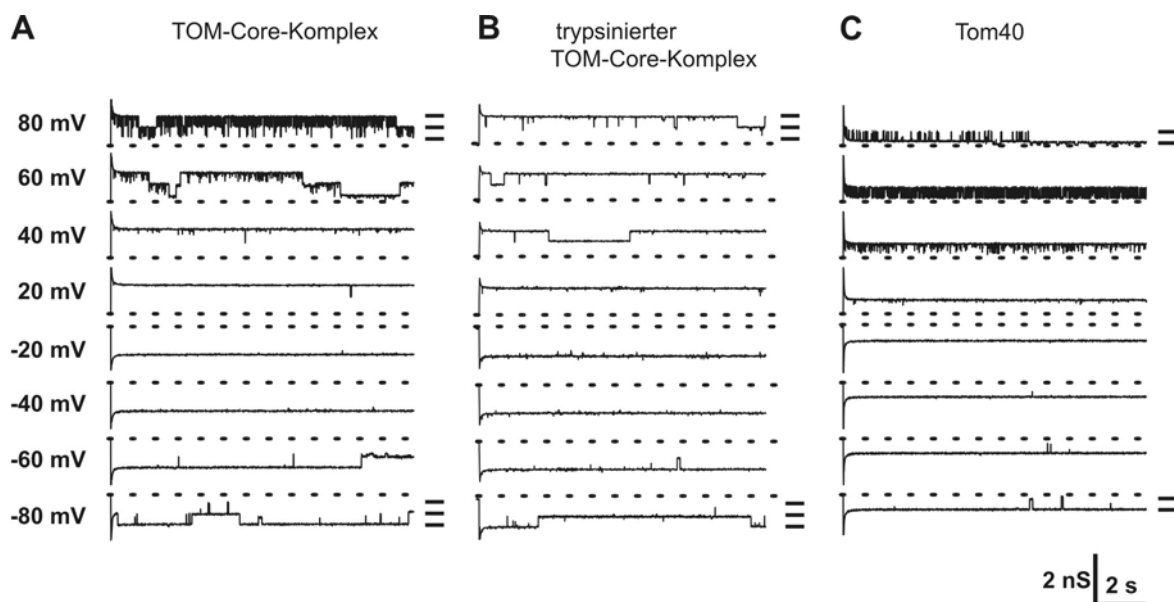


Abbildung 30: Einzelkanalaktivitäten von TOM-Core-Komplex, trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex

G/t-Kurven von in Lipidmembranen inserierten Einzelkanälen von (A) TOM-Core-Komplex, (B) trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und (C) Tom40-Komplex. Die Messungen wurden bei 150 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7,0 durchgeführt. Das Membranpotential lag zwischen -80 und +80 mV. Die gestrichelte Gerade repräsentiert den 0 pA-Level. Die Daten wurden bei 400 Hz digitalisiert und bei 200 Hz gefiltert. Die hauptsächlichen Leitfähigkeitsniveaus sind jeweils rechts an den bei +80 und -80 mV gemessenen Kurven angezeigt.

In Versuchen mit TOM-Core-Komplex wurden bei einer Elektrolytkonzentration von 150 mM KCl Kanäle gemessen, die durch drei hauptsächliche Leitfähigkeitsniveaus von 1100 pS, 660 pS und 220 pS charakterisiert waren (Abb.30A). Bei Membranspannungen von mehr als 60

mV konnte ein schneller Wechsel zwischen den verschiedenen Leitfähigkeitsniveaus (Flickern) beobachtet werden. In Messungen an trypsinisiertem TOM-Core-Komplex wurden ganz ähnliche Ergebnisse erzielt, allerdings war das Flickern bei hohen Spannungen reduziert (Abb.30B). Diese Kanäle wiesen also ein anderes Schließungsverhalten auf. Offenbar wirkte sich das Fehlen der hydrophilen Domänen von Tom22 und der kleinen Tom-Komponenten auf das Schließungsverhalten aus.

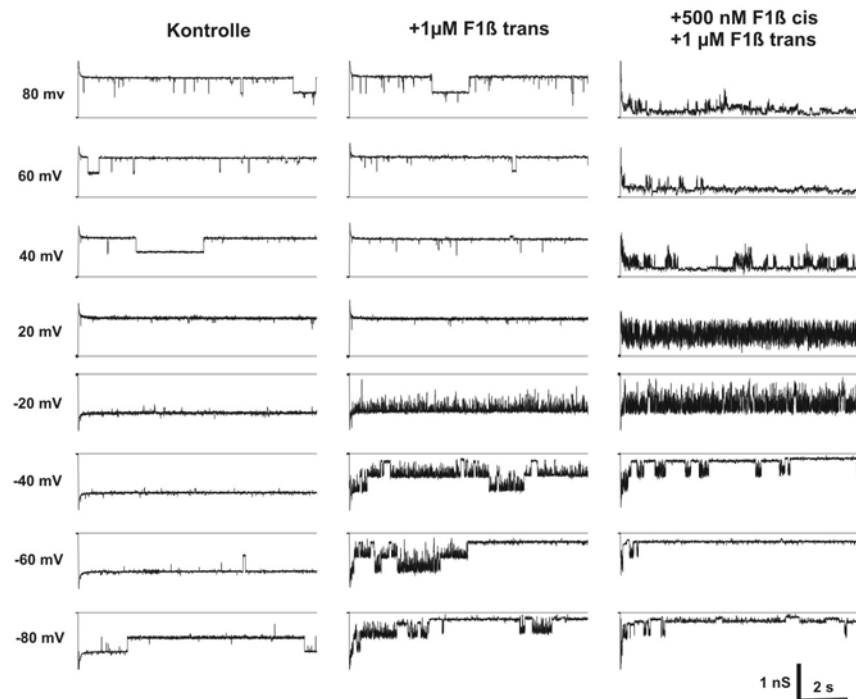
In Experimenten mit isoliertem Tom40 wurden Kanäle beobachtet, die zwei hauptsächliche Leitfähigkeitsniveaus von 550 pS und 110 pS aufwiesen (Abb.30C). Interessanterweise entsprach das obere Leitfähigkeitsniveau von Tom40 der Hälfte des maximalen Leitfähigkeitsniveaus des TOM-Core-Komplexes. Möglicherweise lag dieser Beobachtung eine monomere Kanalstruktur von Tom40 zugrunde.

3.3.2.2 Die Kanalaktivität von trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex läßt sich durch Präpeptid hemmen

Im Kapitel 3.3.1 wurde gezeigt, daß isolierter TOM-Core-Komplex und trypsinisierter TOM-Core-Komplex Vorstufenprotein erkennt und bindet. Um die Frage zu beantworten, ob die von den verschiedenen TOM-Komplexformen gebildeten Kanäle auch mit mitochondrialen Signalpeptiden interagierten, wurde in Einzelkanalmessungen untersucht, ob die Zugabe von solchen Peptiden zur Schließung der Kanäle führt.

Bei Zugabe von Präpeptid der $F_1\beta$ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase zu trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex war die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Einzelkanal geschlossen ist, deutlich erhöht (Abb.31). Voraussetzung hierfür war jedoch ein Membranpotential, das in der Lage war, die Peptide in die Translokationspore zu ziehen. Kontrollpeptide, die keine mitochondrialen Präpeptide waren, zeigten diesen Effekt nicht. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der von trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex gebildeten Kanäle ließen sich also spezifisch vom Präpeptid der $F_1\beta$ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase beeinflussen.

A trypsinisierter TOM-Core-Komplex



B Tom40

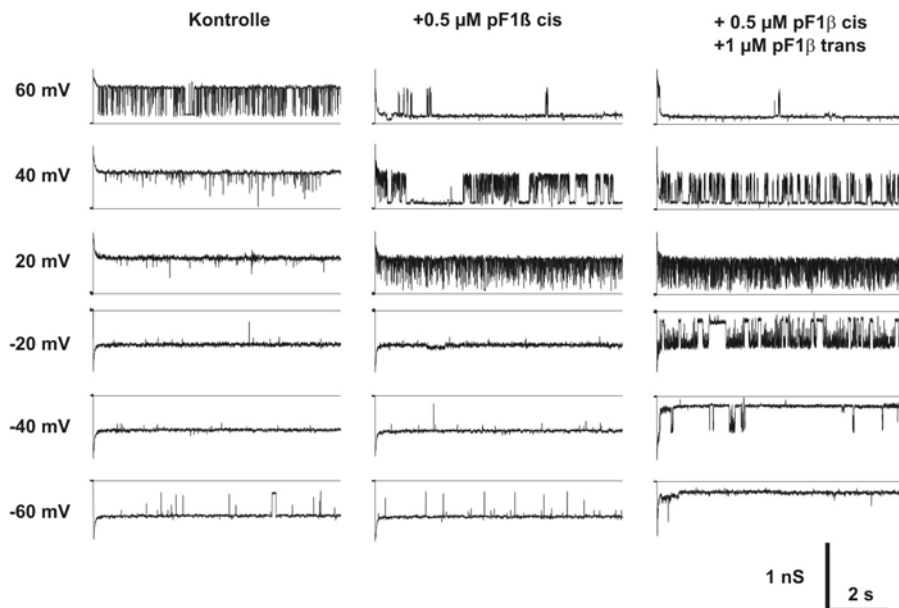


Abbildung 31: Hemmung der Kanalaktivität von trypsinisiertem TOM-Core-Komplex und Tom40-Komplex durch Signalpeptide

Die Kanalaktivität von TOM-Core-Komplex (A) und Tom40 (B) wurde nach Zugabe von Präpeptid der F1β-Untereinheit der F₀F₁-ATPase. Die gestrichelte Gerade repräsentiert den 0 pA-Level. Gemessen wurde in 150 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7,0. Die Daten wurden bei 400 Hz digitalisiert und bei 200 Hz gefiltert. cis, cis-Kammer; trans, trans-Kammer.

3.3.2.3 Tom40 bildet nicht-klassische Kanäle

Neben den oben beschriebenen, in Einzelkanalmessungen mit Tom40 analysierten Kanälen, fanden sich in weniger als 25 % der Fälle bei den Einzelkanalmessungen von Tom40 auch Kanäle, die bei Messungen mit TOM-Holo-Komplex und TOM-Core-Komplex nicht auftraten (Abb.32). Der erste Typ zeigte verschiedene Leitfähigkeitsniveaus und schloß bei höheren angelegten Spannungen (Abb.32A). Der zweite Typ zeigte keine Schließung mit steigender angelegter Spannung (Abb.32B). Überraschenderweise wurden beide Typen von Kanälen von Präpeptiden, die der $F_1\beta$ -Untereinheit der F_0F_1 -ATPase, nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dennoch waren beide Typen dieser „nichtklassischen“ Kanäle kationenselektiv. Es konnte also eindeutig ausgeschlossen werden, daß es sich bei diesen Kanälen um Porin, dem häufigsten Protein der mitochondrialen Außenmembran, handelte.

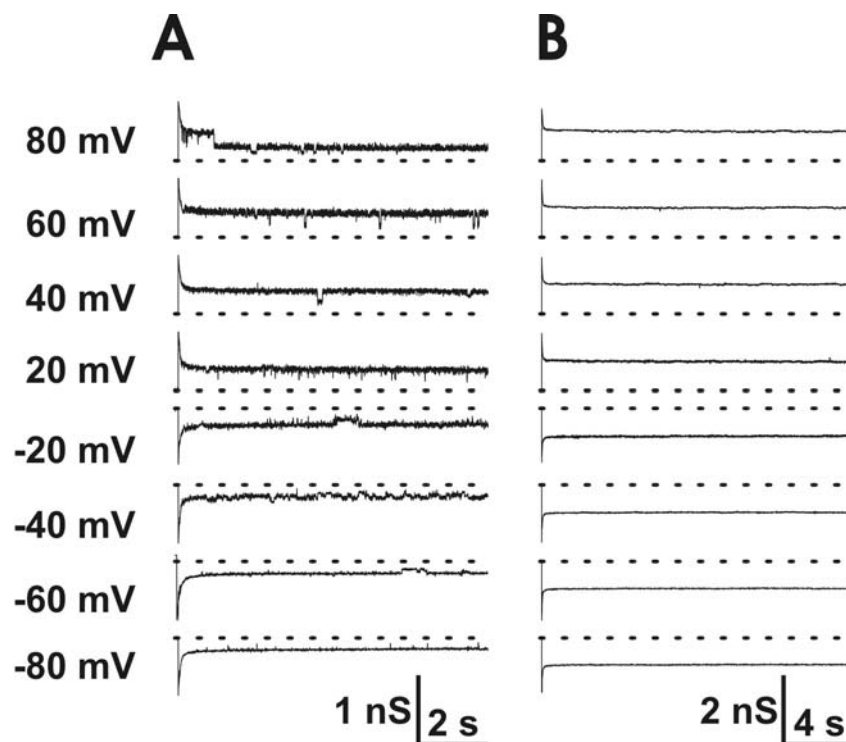


Abbildung 32: Nicht-klassische Kanäle von Tom40

Einzelkanalmessungen von Tom40 in artifiziellen Lipiddoppelmembranen. Links und rechts die Messungen zweier Typen nichtklassischer Kanäle. Gemessen wurde bei Spannungen zwischen -80 mV und 80 mV. Beide Kanäle ließen das charakteristische Flickern der Leitfähigkeit vermissen. Die gestrichelte Gerade repräsentiert den 0 pA-Level. Gemessen wurde in 150 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7,0. Die Daten wurden bei 400 Hz digitalisiert und bei 200 Hz gefiltert.

3.4 Strukturelle Untersuchungen zum TOM-Core-Komplex und zu Tom40

Ein besonders wichtiger Teil dieser Arbeit war die strukturelle Untersuchung des TOM-Komplexes. Hier sollten insbesondere die Strukturen der verschiedenen Formen des TOM-Komplexes auf Grundlage spektroskopischer und elektronenmikroskopischer Methoden miteinander verglichen werden. Da die elektrophysiologischen Daten dafür sprachen, daß Tom40 allein einen Proteintranslokationskanal bilden kann, war die Frage interessant, inwiefern sich die Struktur der TOM-Komplex-Formen, die neben Tom40 noch andere Komponenten enthalten, von der Struktur des Tom40-Komplexes unterscheiden. Das sollte Aufschluß darüber geben, welche Rolle die anderen Komponenten an der Struktur der GIP haben.

In den folgenden Kapiteln wird zunächst die Untersuchung der Sekundärstruktur der verschiedenen Formen des Tom-Komplexes mit Hilfe von CD- und FTIR-Spektren beschrieben. Anschließend wird über die aus elektronenmikroskopischen Bildern gewonnene Struktur des TOM-Core-Komplexes und des Tom40-Komplexes berichtet.

3.4.1 CD-Spektroskopie an TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und mitochondrialem Porin

Vorhersagen zur Sekundärstruktur von Tom40 auf Grundlage der Aminoacylsequenz deuteten darauf hin, daß Tom40 ähnlich den Porinen in β -Faltblättern strukturiert ist (Court *et al.*, 1995; Mannella *et al.*, 1996). Mit der Isolierung des Tom40 konnte dies nun experimentell geprüft werden.

In Abb.33 sind die CD-Spektren von Tom40 und TOM-Core-Komplex dargestellt. Sie wurden bezüglich der Anzahl an Aminosäuren normiert. Zum Vergleich ist auch ein Spektrum von mitochondrialem Porin gezeigt. Das CD-Spektrum von Tom40 zeichnet sich durch einen Nulldurchgang bei 202 nm und ein breites Minimum zwischen 210 und 220 nm aus. Das Spektrum von isoliertem TOM-Core-Komplex zeigt zwei für α -helikale Sekundärstrukturen typische Minima bei 210 und 224 nm sowie einen Nulldurchgang bei 202 nm.

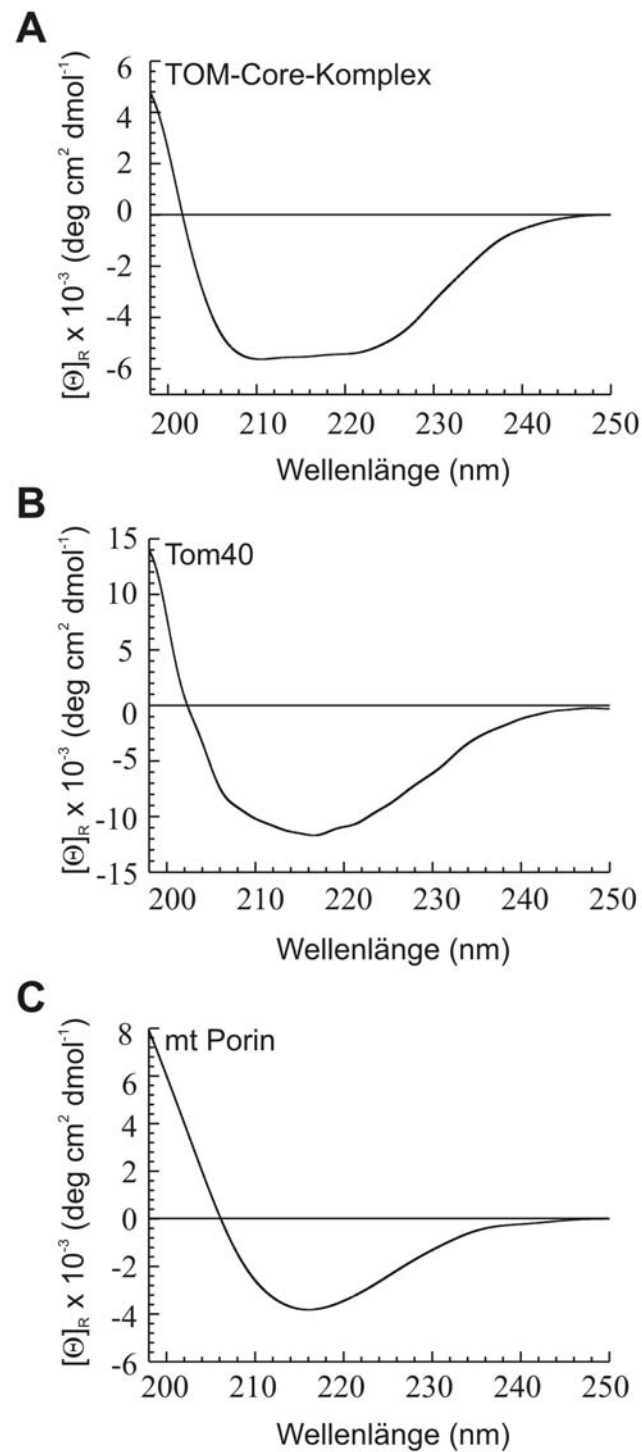


Abbildung 33: CD-Spektrum von TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und mitochondrialem Porin

CD-Spektren von A) TOM-Core-Komplex; B) Tom40-Komplex und C) mitochondrialen Porin. Die Proteine waren jeweils in 0,1 % DDM, 50 mM Kaliumacetat/MOPS, pH 7,0 und 10 % Glycerin solubilisiert. Zehn Einzelspektren wurden bei 4°C gemessen und gemittelt. Die Proteinkonzentration von Tom40 (2,5 μM) und mitochondrialem Porin (6,9 μM) wurden durch UV-Absorptionsspektroskopie bestimmt. Die Proteinkonzentration des TOM-Core-Komplexes wurde durch einen colorimetrischen Test (Bradford) abgeschätzt.

In den CD-Spektren von mitochondrialem Porin beobachtet man dagegen nur ein einziges lokales Minimum bei etwa 216 nm mit relativ geringer Amplitude und eine Rotverschiebung des Nulldurchgangs zu 206 nm. Dies ist ein typisches Spektrum für ein Protein, dessen Sekundärstruktur von β -Faltblättern dominiert wird. Nach diesen Kriterien wäre also das CD-Spektrum von Tom40 zwischen denen von β -Faltblattstrukturen und α -helikalen Proteinen einzuordnen. Eine quantitative Analyse der Sekundärstrukturen (siehe Kabsch and Sander, 1983a, Kabsch and Sander, 1983b) ergab die in der Tabelle 6 aufgeführten α - und β -Strukturanteile. Der α - und β -Anteil des TOM-Core-Komplexes wurde nicht bestimmt, da eine hierfür erforderliche genaue Bestimmung der Proteinkonzentration aufgrund möglicher Unsicherheiten in der Aminosäurezusammensetzung des Core-Komplexes nicht möglich war.

Tabelle 6: Analyse der CD-Spektren und Sekundärstrukturabschätzung von TOM-Core-Komplex, Tom40 und mitochondrialem Porin

	Elptizität = 0	Minima des CD-Spektrums	β -Anteil	α -Anteil	Rest
TOM-Core-Komplex	202 nm	210 u. 224 nm	n.d.	n.d.	n.d.
Tom40-Komplex	202 nm	216 nm	22 %	32 %	46 %
Mitochondriales Porin	206 nm	216 nm	46 %	15 %	39 %

3.4.2 FTIR-Spektroskopie von TOM-Core-Komplex, Tom40-Komplex und mitochondrialem Porin

CD-spektroskopische Untersuchungen an isoliertem Tom40 deuteten darauf hin, daß der β -Faltblatt-Anteil weit geringer war, als bisher angenommen. Um diese Beobachtung weiter zu untermauern, wurden Tom40, TOM-Core-Komplex und mitochondriales Porin mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Typische FTIR-Spektren im Bereich der sogn. Amid-I-Bande zwischen 1705 und 1595 cm^{-1} sind in Abb.37 dargestellt.

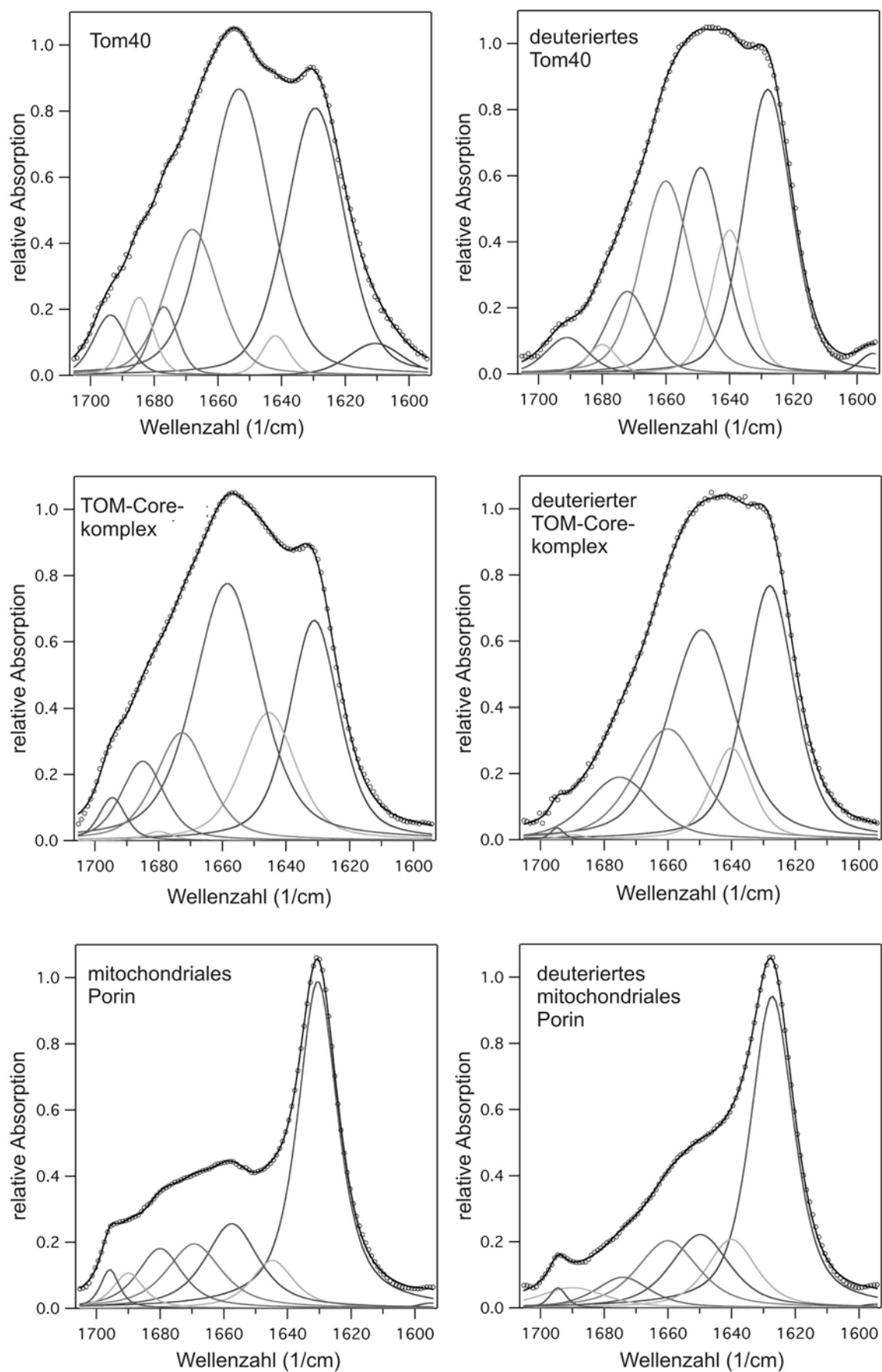


Abbildung 34: FTIR-Spektren von Tom40, TOM-Core-Komplex und mitochondrialem Porin

Die FTIR-Spektren von isoliertem Tom40, TOM-Core-Komplex und mitochondrialem Porin auf Germaniumkristallen wurden mit der ATR-Technik gemessen. Dazu wurden 50 µg Tom40, 80 µg TOM-Core-Komplex und 100 µg Porin auf einem Germanium-Kristall eingetrocknet. Anschließend wurden die Proteine für 120 min mit D₂O gesättigtem N₂-Gas umspült. Danach wurden die Spektren des deuterierten Proteins gemessen. So konnte man durch die Verschiebung der Maxima das durch α -helicale von dem durch ungeordnete Sekundärstrukturanteile bestimmten Maximum trennen. Für die Spektren des mitochondrialen Porins gilt, daß die Basislinie und das Spektrum des Rest-Wassers mit gelösten Lipiden vorher subtrahiert wurde. Die Grafiken zeigen unter den gemessenen Kurven die durch die Dekonvolutierung ermittelten Kurven einzelner Anregungsbanden. Die Superposition dieser Banden ist durch die mit Kreisen gekennzeichnete Kurve dargestellt.

Um zwischen dem Anteil von α -helikalen und sog. „random“-gefalteten Strukturanteilen zwischen 1650 und 1680 cm⁻¹ unterscheiden zu können, wurden auch Spektren nach partieller Deuterierung der Proteine aufgenommen. Es fällt auf, daß sich die Spektren von Tom40 und mitochondrialem Porin insbesondere im Bereich zwischen 1650 und 1670 cm⁻¹ unterscheiden. Die mathematische Dekonvolutierung der Amid-I-Banden (Tabelle 7) nach Kauppinen *et al.*, 1981 und Byler and Susi, 1986 ergab für Tom40 einen signifikant höheren α -Anteil als für mitochondriales Porin. Während das Spektrum von Porin mit einem β -Anteil von ca. 48 % einen typischen Spektrum von β -Faltblattproteinen entsprach, so galt das nicht für Tom40, dessen β -Anteil bei etwa 31 % lag.

Tabelle 7: Sekundärstrukturelemente von TOM-Core-Komplex, Tom40 und mitochondrialem Porin nach Analyse der FTIR-Spektren

	H ₂ O/D ₂ O	β -Anteil	α -Anteil	Rest ¹⁰	Position der β -Bande
TOM-Core-Komplex	H ₂ O	24,2 %			1631.1 [cm ⁻¹]
TOM-Core-Komplex	D ₂ O	30,1 %	33,2 %	36,7 %	1628.0 [cm ⁻¹]
Tom40-Komplex	H ₂ O	31,0 %			1629.4 [cm ⁻¹]
Tom40-Komplex	D ₂ O	30,6 %	21,9 %	47,5 %	1628.0 [cm ⁻¹]
Mt-Porin	H ₂ O	47,9 %			1630.5 [cm ⁻¹]
Mt Porin	D ₂ O	47,6 %	15,0 %	37,4 %	1627.3 [cm ⁻¹]

¹⁰ Der „Rest“ umfaßt Sekundärstrukturanteile wie Loops, Turns usw.

3.4.3 Elektronenmikroskopische Struktur des TOM-Core- und des Tom40-Komplexes

Der gereinigte TOM-Core-Komplex wurde nach Negativ-Kontrastierung mit Uranylacetat in Zusammenarbeit mit Stephan Nußberger in der Abteilung von Prof. Wolfgang Baumeister, MPI für Biochemie, Martinsried, elektronenmikroskopisch untersucht. Wie in Abb.35A zu sehen ist, sah man auf den mikroskopischen Aufnahmen des TOM-Core-Komplexes Partikel, die aus ein und zwei ringförmigen Strukturen bestehen. Weit weniger häufig wurden Partikel mit drei Ringen wie bei dem TOM-Holo-Komplex beobachtet (Künkele *et al.*, 1998a). Ein ähnliches Ergebnis lieferten Bilder von trypsinisiertem TOM-Core-Komplex (Abb.35E).

Um die verschiedenen Ansichten des TOM-Core-Komplexes zu analysieren, wurden 1598 Einzelpartikel visuell ausgewählt. Die Einzelbilder wurden unter Verwendung des EM-Programmpakets (siehe 2.7.5.) durch Verschiebung und Rotation zur Deckung gebracht. Hierbei wurde ein künstliches Doppelring-Modell als erstes Referenzmuster verwendet.

Durch statistische Analyse der Variabilität unter den einzelnen Bildern (MSA; aus dem Englischen: multivariate statistical analysis) und anschließende Einteilung in verschiedene Klassen, wurde der Datensatz in 20 Gruppen aufgeteilt (Abb.35B). Die Hauptunterschiede der verschiedenen Gruppen bezogen sich hierbei auf die Anzahl und die Ausrichtung der Poren. Diejenigen Klassen, die teilweise zerfallene Partikel darstellten, wurden aus dem Datensatz entfernt. MSA sowie die Einteilung in verschiedene Klassen wurden wiederholt. Die gemittelten Ansichten der Einzelbilder jeder Klasse sind in Abbildung 38C und D dargestellt. Sie repräsentieren 866 Einzelpartikel mit zwei und 306 Partikel mit einer Pore. Die Auflösung der Projektion mit zwei Poren betrug auf Grundlage der sog. Fourier Ring Korrelation $(24 \text{ Å})^{-1}$. Der Abstand zwischen zwei Poren betrug etwa 5 nm und der Durchmesser einer einzelnen Pore etwa 2,1 nm. Ausgehend von einem spezifischen Volumen eines Proteins von $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$ (Richards, 1977), kann aus der Projektion in einer ersten Näherung das Molekulargewicht des Komplexes errechnet werden.

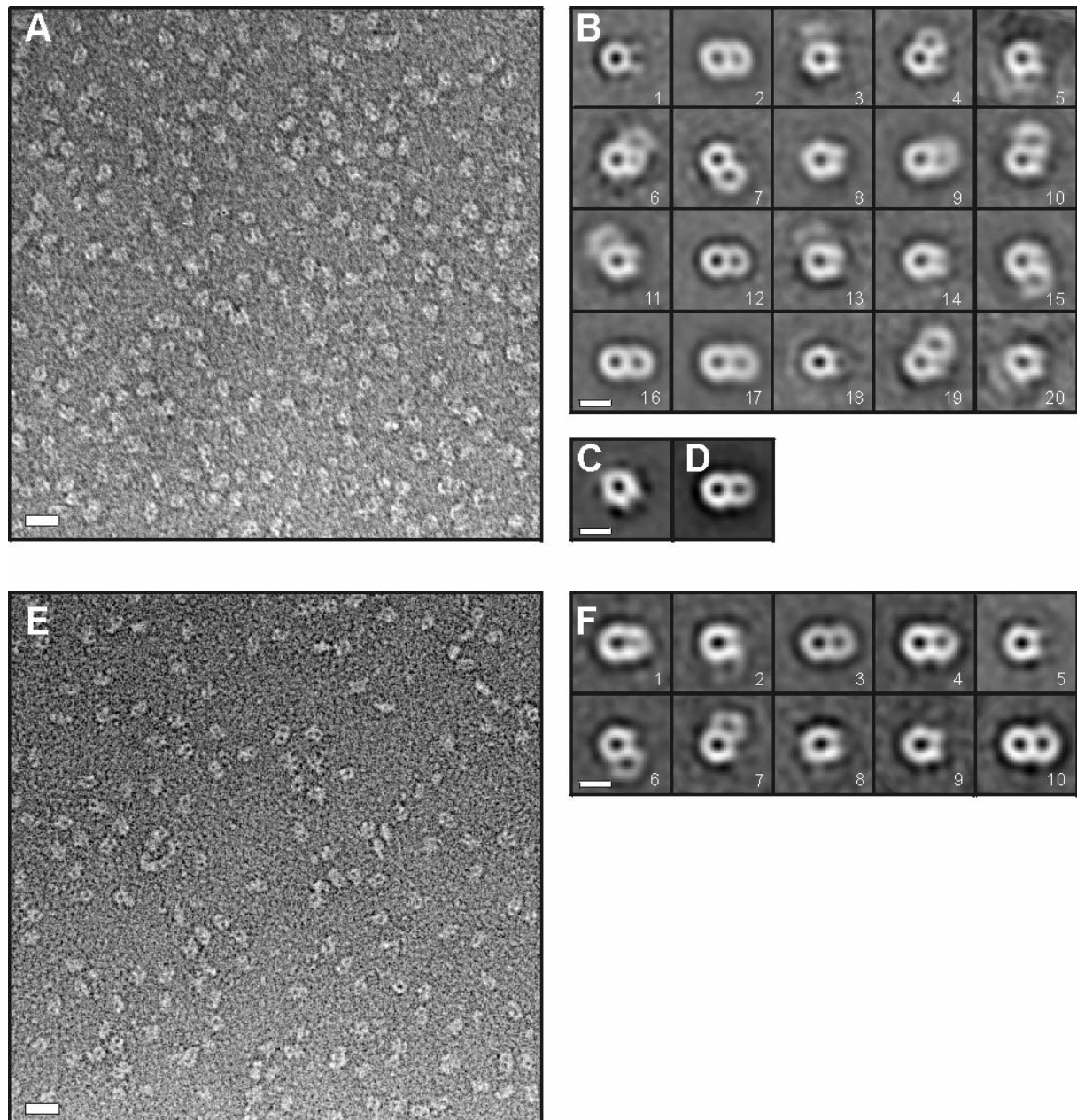


Abbildung 35: EM-Bilder und Einzelpartikelanalyse von TOM-Core-Komplex und trypsinisiertem TOM-Core-Komplex

(A) Elektronenmikroskopisches Bild von TOM-Core-Komplex-Partikeln. Balken, 11 nm. (B) Klassifizierungsanalyse von 1598 Einzelpartikelbildern von TOM-Core-Komplex. Die Klassen 1-20 zeigen gemittelte Bilder von 77, 175, 36, 59, 32, 39, 50, 102, 121, 40, 59, 163, 26, 59, 79, 159, 211, 50, 46 bzw. 15 Einzelpartikelbildern. Balken, 7 nm. (C) und (D) Bildvergleich zusammengefaßter Klassen mit einem Ring bzw. zwei Ringen. (C) zeigt ein gemitteltes Bild von 306, (D) das von 866 Einzelpartikelbildern. (E) Elektronenmikroskopisches Bild von trypsinisierten TOM-Core-Komplex-Partikeln. Balken, 11 nm. (F) Klassifizierungsanalyse von 777 Einzelpartikelbildern des trypsinisierten TOM-Core-Komplexes. Die Klassen 1-10 zeigen gemittelte Bilder von 51, 59, 131, 93, 120, 88, 34, 40, 35 bzw. 102 Einzelpartikelbildern. Klassen mit weniger als 10 Partikelbildern sind nicht dargestellt. Balken, 7 nm.

Unter der Annahme eines Partikels mit den Dimensionen 13,5 nm in der Längsachse, 6,8 nm in der kurzen Achse und einer Höhe von 5-6 nm,

entsprechend der Dicke der mitochondrialen Außenmembran, kommt man bei Berücksichtigung von zwei zylindrischen Poren von 2 nm Durchmesser zu einer Schätzung des Molekulargewichts von 400-500 kDa.

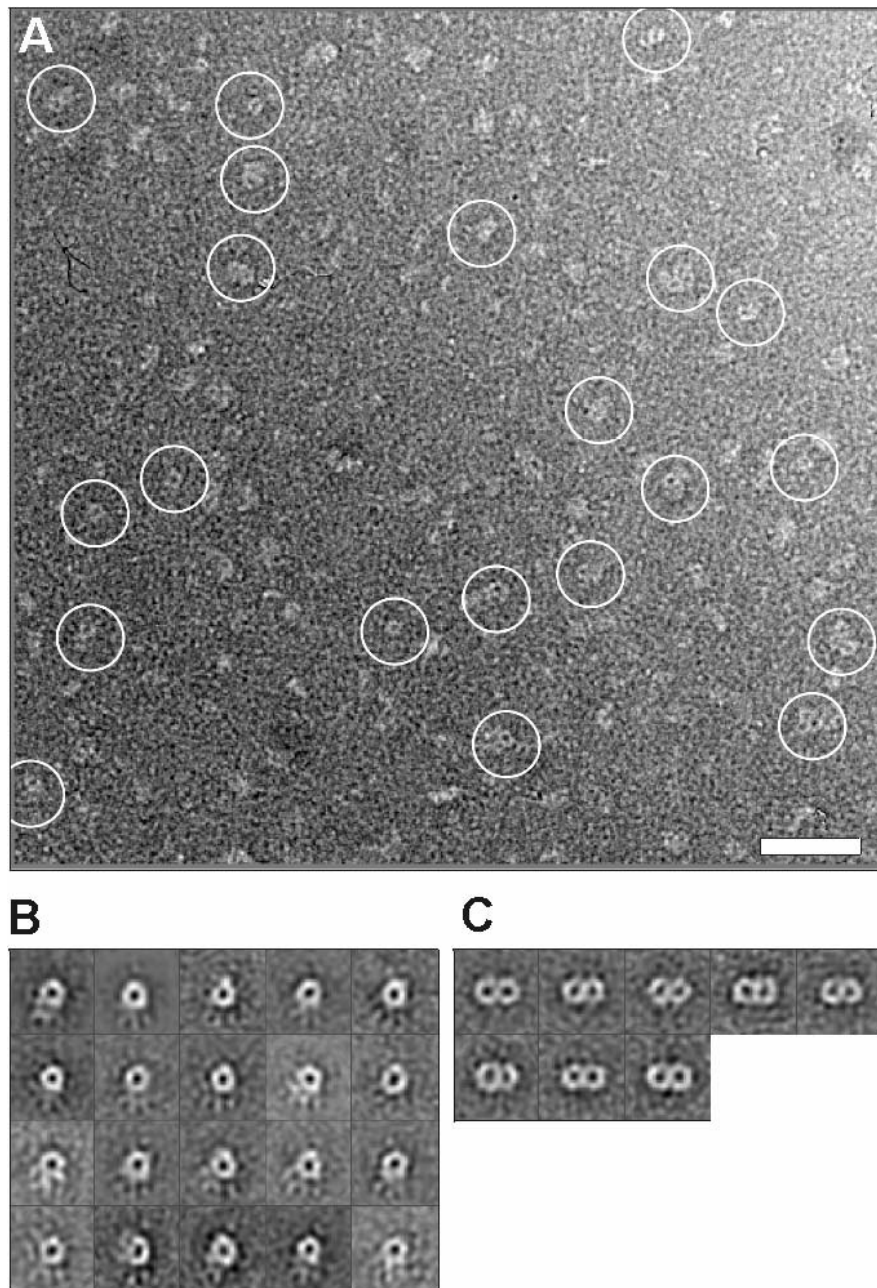


Abbildung 36: EM-Bilder und Einzelpartikelanalyse von Tom40-Komplex

A: Elektronenmikroskopisches Bild von Tom40-Komplex-Partikeln. Der weiße Balken repräsentiert eine Länge von 11 nm. Visuell ausgewählte Einzelpartikelbilder von Tom40 sind markiert. 1550 Tom40-Partikel wurden visuell ausgewählt und nach MSA analysiert. Basierend auf der Eigenimage-Analyse wurden die Daten der beiden prominentesten Gruppen in jeweils 20 Klassen aufgetrennt: Ein-Loch-Partikel (B) und Zwei-Loch-Partikel (C). Klassen mit weniger als 10 Partikeln wurden nicht gezeigt.

Die Analyse von 777 Einzelpartikelbildern von trypsinisiertem TOM-Core-Komplex mit einer Aufteilung des Datensatzes in 20 Gruppen, ergab fünf Klassen mit 448 Einzelpartikeln von zwei Poren und fünf mit 305 Einzelpartikeln von einer Pore (Abb.35F). Klassen mit weniger als 10 Partikelbildern wurden nicht berücksichtigt. Das Verhältnis von Zweilochpartikeln zu Einlochpartikeln war zwar etwas zu letzteren verschoben, das gemittelte Bild des Zweilochpartikels entsprach jedoch exakt dem des nicht-trypsinisierten Komplexes. Die Grundstrukturen von TOM-Core-Komplex und trypsinisiertem TOM-Core-Komplex waren weitgehend identisch. Die hydrophilen Domänen von Tom22 und der kleinen Tom-Komponenten konnten im elektronenmikroskopischen Bild nicht aufgelöst werden.

Isolierter und gereinigter Tom40-Komplex wurde ganz analog zum TOM-Core-Komplex elektronenmikroskopisch untersucht. Auf den mikroskopischen Aufnahmen waren Partikel zu sehen, die aus ein und zwei ringförmigen Strukturen zu bestehen schienen (Abb.36). Allerdings war die Häufigkeitsverteilung der Einzelpartikelbilder eindeutig von den Zweiringpartikeln zu den Einringpartikeln hin verschoben.

3.4.4 Dreidimensionale Rekonstruktion des TOM-Core-Komplexes

Um zu klären, ob die Uranylacetat-gefüllten Zentren der Ringe des TOM-Core-Komplexes wirklich durchgehende Poren wiedergaben, wurde von Stephan Nußberger eine dreidimensionale Rekonstruktion des TOM-Core-Komplexes auf Grundlage elektronentomographischer Verfahren durchgeführt. Dazu wurden dreidimensionale Bilder von 321 TOM-Core-Komplexen individuell aus insgesamt 6741 Projektionen, die bei unterschiedlichen Kippwinkeln aufgenommen waren, rekonstruiert. Anschließend wurden diese Bilder klassifiziert und iterativ aufeinander aligniert. Jedem Berechnungszyklus der Rekonstitution wurde das Ergebnis des letzten Berechnungszyklus als Referenz zugrundegelegt. Da die individuelle Ober- bzw. Unterseite der Partikel nicht bekannt war, wurde bei jedem Berechnungszyklus der Rekonstruktion grundsätzlich die Rotation

um alle drei Raumachsen und die Verschiebung in allen drei Raumrichtungen erlaubt. Für die schlußendliche dreidimensionale Rekonstruktion wurde die stärkste Klasse, bestehend aus 116 Einzelrekonstruktionen, ausgewählt (Abb.37). Das dreidimensionale Bild wurde auf Grundlage einer Proteindichte von $1,36 \text{ g/cm}^3$ und einer Masse von 410 kDa konstruiert.

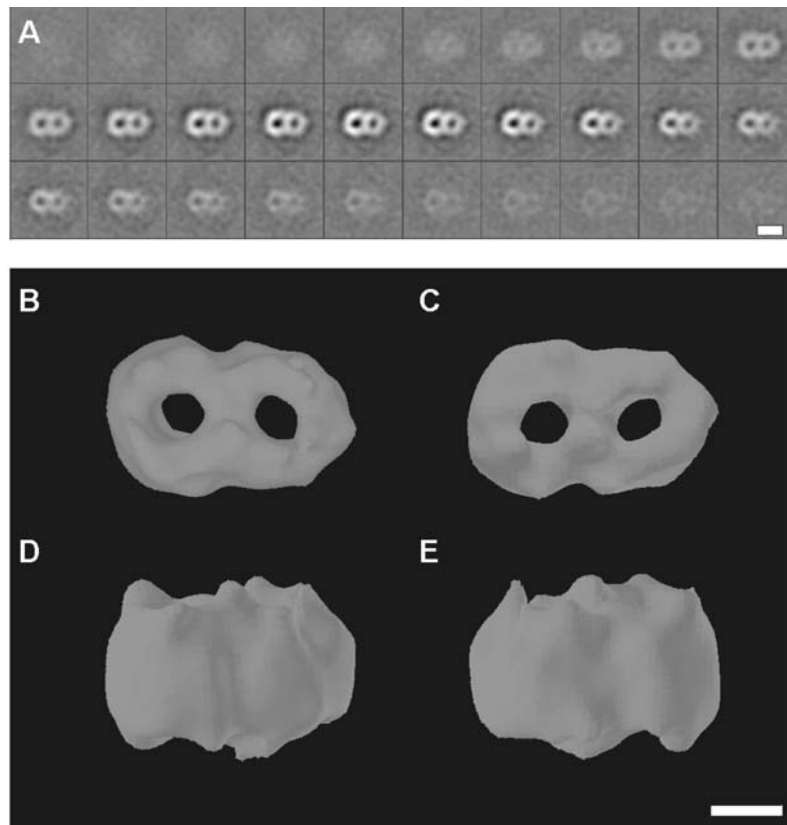


Abbildung 37: Rekonstruiertes dreidimensionales Bild des TOM-Core-Komplexes

Das mittels Elektronen-Tomographie ermittelte dreidimensionale Bild des TOM-Core-Komplexes (für Details siehe Text). (A) 64 horizontale Schnitte im Abstand von 0,344 nm von oben nach unten durch das dreidimensionale Bild des TOM-Core-Komplexes. Der Balken repräsentiert 7 nm. (B) Ansicht des dreidimensionalen Bildes von oben. (C) Ansicht des dreidimensionalen Bildes von unten. (D) und (E) Seitenansichten. Das von der dargestellten Isofläche umschlossene Volumen entspricht 64 % der Masse von 410 kDa. Balken, 3,5 nm.

Eindeutig ergaben sich in der dreidimensionalen Rekonstruktion zwei durch den gesamten Partikel reichende, zylinderförmige Öffnungen mit einem Durchmesser von ca. 2,1 nm.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Subkomplexe der Proteintranslokase mitochondrialer Außenmembran isoliert und charakterisiert. Diese Subkomplexe wurden durch die Einwirkung von bestimmten Detergentien und Proteasen auf den TOM-Komplex erhalten (Abb.38).

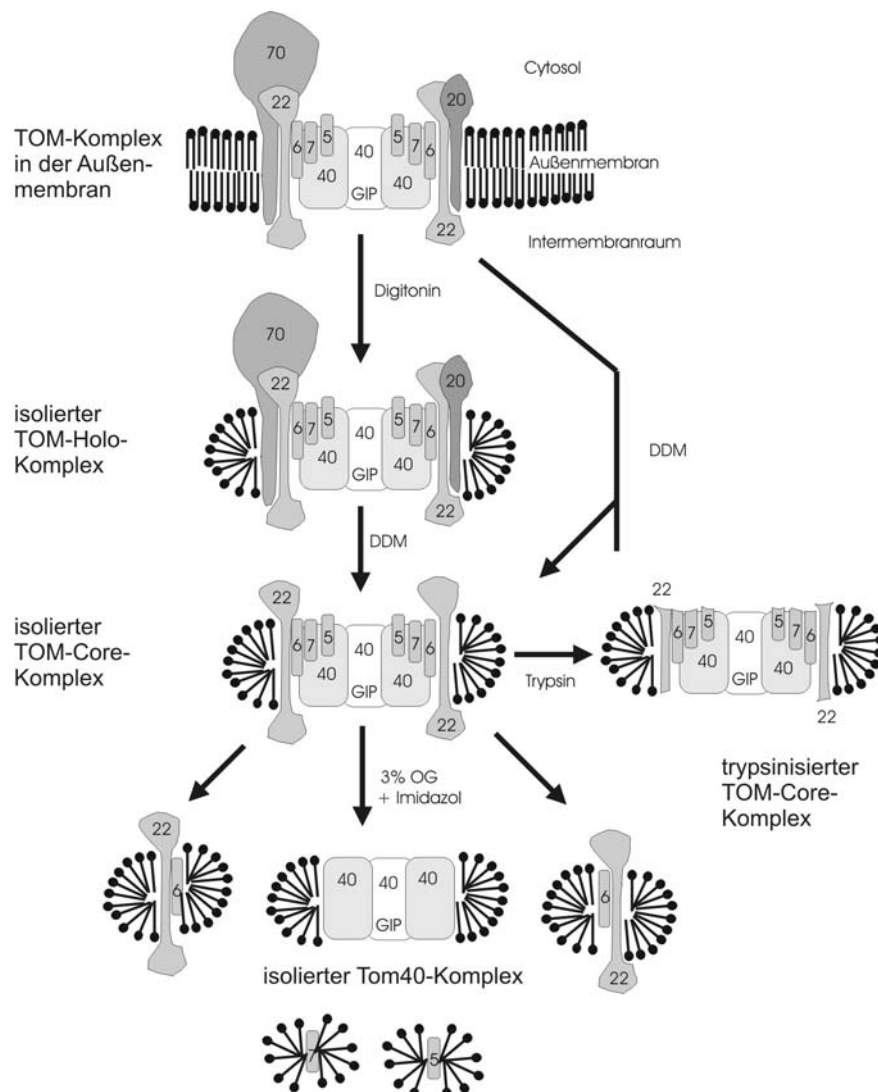


Abbildung 38: Formen des TOM-Komplexes

Schematische Darstellung verschiedener TOM-Subkomplexe, die in dieser Arbeit beschrieben, isoliert und charakterisiert wurden. Die Nummern stehen für die dazugehörigen Tom-Proteine; GIP, Generelle Importpore. Die Art der Umwandlung von einer Komplexform in die andere ist an den Pfeilen jeweils kurz angegeben.

Isoliert und charakterisiert wurden in dieser Arbeit speziell

- der TOM-Core-Komplex mit den Komponenten Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5,
- ein TOM-Core-Komplex, der aus Tom40 und nur den hydrophoben Domänen von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom 5 bestand, und
- ein Tom40-Komplex, der ausschließlich aus Tom40 bestand.

Alle diese Subkomplexe bildeten wie der TOM-Holo-Komplex Strukturen, die im EM-Bild ähnlich zueinander aussahen, und in Lipiddoppelmembranen Kanäle mit ähnlichen Eigenschaften bildeten.

4.1 Der Zusammensetzung des TOM-Komplexes

4.1.1 Tom5 in *Neurospora crassa*

Eine mit dem TOM-Core-Komplex aus *Neurospora crassa* aufgereinigte Proteinkomponente des TOM-Komplexes konnte als 5 kDa-Protein in seiner Sequenz bestimmt werden. Da das Protein in Größe und Sequenz Ähnlichkeiten zur in *Saccharomyces cerevisiae* bekannten Tom-Komponente Tom5 aufweist, kann man sicher mit Berechtigung von dem neu identifizierten Protein als „*Neurospora crassa*-Tom5“ sprechen.

Für Tom5 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, daß es für den Eintransport von Vorstufenproteinen in die Mitochondrien von großer Bedeutung ist. In einer Deletionsmutante, Δ tom5, war der Import vieler mitochondrialer Proteine, insbesondere Su9-DHFR, Porin, AAC und F₁β signifikant vermindert. Außerdem zeigte diese Mutante einen charakteristischen temperatursensitiven Phänotyp: Bei 30°C war das Wachstum auf Medien mit fermentierbaren und auch nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen signifikant schlechter als das des Wildtyps. Bei 37°C war kein Wachstum mehr zu beobachten (Dietmeier *et al.*, 1997). Solche Wachstumsdefekte waren bei Deletionsmutanten der anderen kleinen Tom-Komponenten Tom6 und Tom7 nicht beobachtet worden (Kassenbrock *et al.*, 1993, Honlinger *et al.*, 1996). Ob Tom5 aus *Neurospora crassa* ein funktionelles Homolog zu Tom5 der Hefe darstellt, muß noch gezeigt werden.

Die Struktur des carboxyterminalen, 26 Aminoacylreste langen Peptids von Hefe-Tom5 wurde mittels CD- und NMR-Spektroskopie untersucht. Demnach bildet der Carboxyterminus eine Helix mit einer charakteristischen Verteilung negativ geladener Aminoacylreste (Hammen and Weiner, 2000). Zwei prominente Glutamatreste E13 und E19 sind in Hefe- und *Neurospora crassa*-Tom5 konserviert (siehe Abb.14D). Wenn es richtig ist, daß Tom5 während der Proteintranslokation als Rezeptor für die Vorstufenproteine fungiert (Dietmeier *et al.*, 1997), könnten diese beiden Aminoacylreste an der Interaktion mit der translozierenden Polypeptidkette mitbeteiligt sein.

4.1.2 Die Molekülmasse der verschiedenen Arten des TOM-Komplexes

Die Molekülmasse des TOM-Holo-Komplexes aus *Neurospora crassa* wurde in früheren Untersuchungen durch Gelfiltration in Digitonin-solubilisierten Mitochondrien zuerst auf 400-600 kDa (Kiebler *et al.*, 1990), später genauer auf 550-600 kDa (Künkele *et al.*, 1998a) und 600 kDa bestimmt (Rapaport *et al.*, 1998a). Im Vergleich zu den bisherigen Bestimmungen der Molekülmasse des TOM-Komplexes ergaben in der vorliegenden Arbeit Gelfiltrationsläufe für den durch Zerlegung gewonnenen bzw. den in DDM isolierten TOM-Core-Komplex ca. 410 kDa. In beiden Fällen ist die Molekülmasse geringer als bisher angenommen. Dies kann zwei Gründe haben. Es könnte sich die Zusammensetzung der früher isolierten TOM-Komplexe von den in der vorliegenden Arbeit hochaufgereinigten unterscheiden oder die bisherigen Gelfiltrationsläufe waren aufgrund unterschiedlicher Größe der Detergensmizellen, die die TOM-Komplexe in Lösung hielten, fehlerhaft.

Im Blau-Nativgel traten ähnliche Probleme auf: Auch in dieser Methode schien das Detergens das Laufverhalten des TOM-Komplexes zu beeinflussen. Die Größen des TOM-Holo- und Core-Komplexes ließen sich zwar auf ca. 400 kDa bestimmen, verlässlicher als der in der Gelfiltration bestimmte Wert schien dieser Wert aber nicht zu sein. Der TOM-Holo-Komplex in Digitonin zerfiel zum TOM-Core-Komplex (Tom70 und Tom20 fehlen in der Bande), die Bande lief aber trotzdem auf anderer Höhe als der

TOM-Core-Komplex in DDM, der die selben Komponenten enthält. Die unterschiedliche Höhe der Banden des TOM-Komplexes fand sich ebenso in mit Digitonin bzw. mit DDM solubilisierten Außenmembranvesikeln. Offensichtlich wurde die Migrationsgeschwindigkeit von der Art des Detergens beeinflusst.

Allein die analytische Ultrazentrifugation konnte schließlich verlässliche Werte liefern. Das liegt daran, daß sich bei der Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation ein Gleichgewicht einstellt. Bei der Gelfiltrationschromatographie und Blau-Nativgel-Elektrophorese stellt sich kein Gleichgewicht ein. Führt man die Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation bei sog. „gravitational transparency“ durch, dann können Detergenzmizellen das Ergebnis nicht verfälschen. Die Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes konnte mit Hilfe dieser Methode auf 390 kDa (± 20 kDa) bestimmt werden.

Daß sich der trypsinisierte TOM-Komplex in der Gelfiltration ganz ähnlich verhielt wie der TOM-Core-Komplex, muß so verstanden werden, daß die entfernten Teile des Komplexes nicht wesentlich zur Gestalt und zur Struktur des Komplexes beitragen. Dies paßt dazu, daß Einzelpartikel des trypsinisierten TOM-Core-Komplexes unter dem EM ganz ähnlich denen des nichttrypsinisierten TOM-Core-Komplexes aussehen.

Die Frage bleibt, warum einerseits Indizien dafür vorliegen, daß der isolierte TOM-Core-Komplex weitgehend homogen war (Blau-Nativgel, Gelfiltration, analytische Ultrazentrifugation), andererseits jedoch Heterogenitäten in den EM-Bildern in Form von Einloch- und Zweilochpartikeln feststellbar waren. Das ließe sich damit erklären, daß die Präparation der Probe für die EM-Bilder zu Artefakten führten. Warum sollten aber dann die Zweilochpartikel die „echten“ TOM-Core-Komplexe sein? Diese entsprechen am ehesten der bestimmten Größe des TOM-Core-Komplexes, so wie die Dreilochpartikel am ehesten zur bestimmten Größe des TOM-Holo-Komplexes passen. Daß in Präparationen vom Tom40-Komplex bevorzugt Einlochpartikel gefunden wurden, spricht außerdem dafür, daß nicht diese Einlochpartikel der höheren Oligomerisierungsstufe des TOM-Core-Komplexes entsprechen.

Interessant ist, daß der TOM-Core-Komplex mit bis zu acht gebundenen pSu9-DHFR-Molekülen in der Gelfiltration nicht merklich anders eluierte als

der TOM-Core-Komplex ohne gebundene Vorstufenproteinmoleküle. Da das Laufverhalten eines Moleküls in der Gelfiltration nicht eigentlich von seiner Masse, sondern von seiner Gestalt bestimmt wird, kann man davon ausgehen, daß die gebundenen Vorstufenproteinmoleküle nichts Wesentliches zur Gestalt des Moleküls hinzufügen.

Die Heterogenitäten in den Präparationen des Tom40-Komplexes ließen sich bereits im Blau-Nativgel und der Gelfiltration feststellen, wobei sich die distinkten Banden im Blau-Nativgel in der Gelfiltration nicht auflösen ließen. Wegen dieser Heterogenität läßt sich die Größe des Tom40-Komplexes, wie sie mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt wurde, nur als Summe verschiedener Formen von Tom40-Komplexen verstehen. Im EM-Bild dominierten an geordneten Strukturen eindeutig die Einlochpartikel, so daß diese in dieser Arbeit als die Hauptform des Tom40-Komplexes analysiert wurden. Die ungeordneten Strukturen in den EM-Bildern reflektieren die Heterogenität der Tom40-Präparationen, aber auch die Bildung nichtklassischer Kanäle durch das isolierte Tom40 (siehe unten).

4.1.3 Die Stöchiometrie des TOM-Core-Komplexes

Auf Grundlage der mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmten Molekülmasse des TOM-Core-Komplexes wurde die Stöchiometrie des TOM-Core-Komplexes in dieser Arbeit auf 8 : 4 : 2 : 1 bzw. 8 : 4 : 2 : 2 für Tom40 : Tom22 : Tom6 : Tom7 bestimmt. Tom5 konnte nicht berücksichtigt werden, trägt aber schwerlich viel zur Molekülmasse des Komplexes bei und kann die Stöchiometrie der anderen Komponenten somit kaum beeinflussen.

Die Stöchiometrie des TOM-Holo-Komplexes aus *Neurospora crassa* war zuvor auf 1,5 : 8 : 3 : 2 für Tom70 : Tom40 : Tom22 : Tom20 mit einer theoretischen Molekülmasse von 504 kDa ohne die kleinen Tom-Komponenten bestimmt worden (Künkele *et al.*, 1998a). Frühere, durch Coimmunfällung gewonnene Daten (Kiebler *et al.*, 1990 und Söllner *et al.*, 1992) können aufgrund methodischer Unwägbarkeiten, nicht das gleiche Vertrauen genießen. Für den TOM-Holo-Komplex aus *Saccharomyces*

cerevisiae konnten durch standardisierte Immundekoration (Dekker *et al.*, 1998) die Stöchiometrien nur abgeschätzt werden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der nach unterschiedlichen Methoden bestimmten Stöchiometrien der verschiedenen TOM-Komplexe

	Kiebler et al., 1990	Söllner et al., 1992	Dekker et al., 1998	Künkele et al., 1998	Diese Arbeit
	Coimmunfällung	Coimmunfällung	Standardisierte Immundekoration	Affinitätsreinigung	Affinitätsreinigung
	TOM-Holo-Kom- plex	TOM-Holo-Kom- plex	TOM-Holo-Kom- plex	TOM-Holo-Komplex	TOM-Core-Komplex
	<i>N. crassa</i>	<i>N. crassa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>N. crassa</i>	<i>N. crassa</i>
Tom70	0,5	0,5	1	1,5	-
Tom40	1	1	4-6	8	8
Tom30	-	0,4	-	-	-
Tom22	0,6	0,6	3-6	3	4
Tom20	1	1	1	2	-
Tom7	n.d.	1	n.d.	n.d.	1-2
Tom6	n.d.	1	n.d.	n.d.	2
Tom5	-	1	n.d.	-	-

Absolute Gewißheit über die Zusammensetzung des TOM-Komplexes kann nur die Bestimmung der atomaren Struktur des Komplexes mittels röntgen- oder elektronenkristallographischer Methoden an 3D oder 2D-Kristallen liefern. Möglicherweise könnte aber bereits auch eine höhere Auflösung von EM-Bildern von in vitrifiziertem Eis eingebetteten TOM-Core-Komplex-Partikeln weitere Hinweise liefern. So sollten beispielsweise mögliche Symmetrien mit der Anzahl der Tom40-Untereinheiten korrelieren. Auch Versuche zur chemischen Quervernetzung der einzelnen Komponenten im TOM-Komplex miteinander könnten Aufschluß über die Anzahl der im Komplex enthaltenen Komponenten geben.

4.2 Die Kanaleigenschaften des TOM-Komplexes

Die in Kap. 3.3.2 dargelegten elektrophysiologischen Experimente haben gezeigt, daß der TOM-Core-Komplex mit und ohne die hydrophilen Domänen der Untereinheiten Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 in Lipiddoppelmembranen Poren bildet. In weiterführenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß Tom40 an der Ausbildung des Proteintranslokationskanals beteiligt ist. Damit bestätigten sich Experimente von Pfanner und Mitarbeitern (Hill *et al.*, 1998), die ebenfalls gezeigt haben, daß Tom40 die zentrale kanalbildende Komponente der TOM-Proteintranslokationsmaschinerie ist.

In den Einzelkanalmessungen unterschieden sich die von Tom40 gebildeten Kanäle von den anderen Formen des TOM-Komplexes dadurch, daß ihre höchste Leitfähigkeit genau die Hälfte der höchsten Leitfähigkeit dieser betrug (550 pS gegenüber 1100 pS bei 150 mM KCl) und daß jene ein Leitfähigkeitsniveau weniger aufwiesen als diese. Offensichtlich wurde bei Tom40 eine monomere Kanalform, bei allen anderen Formen des TOM-Komplexes ein dimerer Kanal gemessen. Interessanterweise korrelierte dies mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Einlochpartikel in Bildern vom Tom40-Komplex, Zweilochpartikel in Bildern aller anderen Formen des TOM-Komplexes.

Die Wahrscheinlichkeit, daß sich die von Tom40 gebildeten Kanäle in geöffnetem Zustand befanden, konnte durch die Zugabe von mitochondrialem Präpeptid in analoger Weise wie bei den anderen Formen des TOM-Komplexes beeinflusst werden: Die Zugabe des Präpeptids auf eine Seite der Membran führte zur bevorzugten Schließung der Kanäle, während nicht-mitochondriale Kontrollpeptide diese Wirkung nicht hatten (für den TOM-Holo-Komplex siehe Künkele *et al.*, 1998b).

Beim Vergleich der elektrophysiologischen Charakteristika von *Neurospora crassa* Tom40 und rekombinant exprimiertem Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hill *et al.*, 1998) fallen zwei Punkte auf: Erstens ist die gemessene höchste Leitfähigkeit des vom rekombinanten Hefe-Tom40 gebildeten Kanals (360 pS bei 250 mM KCl) viel geringer als die gemessene höchste

Leitfähigkeit des vom isolierten *Neurospora*-Tom40-Komplex gebildeten (550 pS bei 150 mM KCl); Zweitens setzten Hill *et al.*, 1998 eine mehr als zehnfache Menge an Signalpeptiden ein, um eine Wirkung auf das Schließungsverhalten der Kanäle zu erzielen, als das bei den Kanälen des isolierten Tom40-Komplexes der Fall war. Geht man davon aus, daß Tom40 bei einer Elektrolytkonzentration von 250 mM KCl eine Leitfähigkeit von 910 pS aufweist, dann wiesen die von rekombinantem Hefe-Tom40 gebildeten Kanäle eine weniger als halb so große Leitfähigkeit wie die vom isolierten *Neurospora*-Tom40-Komplex gebildeten auf. Wenn man davon absieht, daß der Hefe-TOM-Komplex sich grundsätzlich anders verhalten könnte als der *Neurospora*-TOM-Komplex, dann gibt der Unterschied in den elektrophysiologischen Messungen der Vermutung Raum, daß das rekombinante Hefe-Tom40 andere Kanäle bildet als das isolierte *Neurospora*-Tom40. Welche Struktur von beiden Tom40's der nativen Struktur näher ist, ist bisher nicht geklärt. Bislang gibt es keine strukturellen Informationen zu Tom40 aus Hefe. Der Vergleich der Circular dichroismusspektren von rekombinantem Hefe-Tom40 und Tom40 aus *Neurospora crassa* spricht dafür, daß das rekombinante Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae* im Zuge der Rückfaltung aus Einschlußkörperchen nicht in seine native Struktur zurückgefaltet ist und auch dem oligomeren Zustand von *Neurospora crassa*-Tom40 nicht entspricht. Die mag auch erklären, warum die Sensitivität der von isoliertem *Neurospora*-Tom40 gebildeten Kanäle gegenüber mitochondrialen Präpeptiden sehr viel größer ist als von denen, die von rekombinantem Hefe-Tom40 gebildet werden.

Die in früheren Studien postulierte Identität des vom TOM-Holo-Komplex gebildeten Kanals und des PSC (engl.: peptid-sensitive channel; Henry *et al.*, 1996, Pelleschi *et al.*, 1997, Künkele *et al.*, 1998b) wird durch die in dieser Arbeit mit den anderen Formen des TOM-Komplexes durchgeführten Messungen bestätigt. Speziell die maximale Leitfähigkeit der vom Tom40-Komplex gebildeten „monomeren“ Kanäle korreliert mit dem mittleren der drei Leitfähigkeitsniveaus des PSC.

Der mit Hilfe der EM-Bilder und der daraus gewonnenen 3D-Rekonstruktion ermittelte Wert für den Durchmesser der Pore der GIP in *Neurospora crassa* von 2,1 nm stimmt gut mit dem Wert überein, der für die GIP in *Saccharomyces cerevisiae*-Mitochondrien mittels Import von an Signalpeptide gekoppelter Goldpartikel definierter Größe ermittelt wurde (2,0-2,6 nm; Schwartz and Matouschek, 1999).

Vergleicht man die Dimension des TOM-Kanals mit denen von Proteintranslokasen in anderen Organellen oder Bakterien, dann stellt man fest, daß die Dimensionen der verschiedenen Translokasekanäle zwar unterschiedlich, aber in ihrer Größenordnung ähnlich sind: Der von Sec61p während des cotranslationalen Eintransportes gebildete Kanal in der ER-Membran hat einen Durchmesser von 2-6 nm (Hamman *et al.*, 1997; Hanein *et al.*, 1996). Der Kanal im bakteriellen SecYEG misst nach elektronenmikroskopischen Bildern 4-6 nm im Durchmesser (Manting *et al.*, 2000). Der von Toc75 in der Chloroplastenaußenmembran gebildete Kanal weist nur einen Durchmesser von 0,8-0,9 nm auf (Hinnah *et al.*, 1997). Wenn eine nichthydratisierte Polypeptidkette in langgestreckter Form einen Durchmesser von 0,5-0,7 nm hat und eine nichthydratisierte α -Helix einen von 1,0-1,2 nm (Hegde and Lingappa, 1997), dann ist klar, daß durch den TOC-Komplex keine Polypeptidketten, die nicht vollständig entfaltet sind, importiert werden können, während sich im Kanal der ER- und der äußeren Mitochondrienmembran durchaus hydratisierte α -Helices aufhalten könnten (1,5-1,7 nm Durchmesser).

Dehydrierte Helices könnten nicht nur transloziert, sondern auch seitlich aus dem Kanal in die Membran entlassen werden. Für diese seitliche Öffnung des Kanals und Freisetzung des Substrats in die Membran liegen im Falle der SEC-Maschinerie im ER starke Evidenzen vor, obgleich es verschiedene Modelle zur Membranproteinintegration in die ER-Membran gibt (Hegde and Lingappa, 1997, Heinrich *et al.*, 2000). Im Kanal der SEC-Maschinerie im ER könnten sogar bis zu fünf α -helikale Transmembranregionen akkumuliert werden (Borel and Simon, 1996).

Der Mechanismus der Membranproteinintegration in die Außenmembran von Mitochondrien ist noch völlig unklar. Für den Import mitochondrialen Porins in *Neurospora crassa*- und *Saccharomyces cerevisiae*-Mitochondrien wurde lediglich festgestellt, daß ein funktioneller TOM-Komplex dafür notwendig ist und das Porin sehr wahrscheinlich über die GIP integriert wird (Krimmer *et al.*, 2001). Der Durchmesser des TOM-Kanals von 2,1 nm ließe den Aufenthalt zumindest einer Transmembranhelix anderer Außenmembranproteine in diesem Kanal zu. Ob diese dann seitlich aus dem Kanal in die Lipiddoppelschicht entlassen werden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.3 Die Bindung von Vorstufenproteinen an den TOM-Komplex und seine Komponenten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Vorstufenproteine *in vitro* präsequenzabhängig an isolierten TOM-Holo-Komplex, TOM-Core-Komplex und tryptinisierten TOM-Core-Komplex binden. Kontrollproteine, die nicht in Mitochondrien importiert werden, banden nicht an den TOM-Komplex. Die Bindung von mitochondrialem Vorstufenprotein an den TOM-Komplex war absättigbar. Das heißt, die Bindung war spezifisch.

Daß der isolierte TOM-Core-Komplex Vorstufenproteine ähnlich gut band wie der TOM-Holo-Komplex, stimmt damit überein, daß Tom70 und Tom20 nicht essentiell sowohl in *Saccharomyces cerevisiae* als auch in *Neurospora crassa* sind und auch bisher keine signifikanten Importdefekte ohne diese Rezeptoren beobachtet wurden (Harkness *et al.*, 1994a, Lithgow *et al.*, 1994b). Auffällige Importdefekte konnten nur festgestellt werden, wenn und insoweit der Expressionsgehalt von Tom22 auf das Expressionsniveau unter 20 % des Wildtyps reduziert war (Künkele, 1999, Lithgow *et al.*, 1994b, Lithgow *et al.*, 1994a). *In vitro*-Versuche legten nahe, daß eine sequentielle Interaktion mitochondrialer Vorstufenproteine zunächst mit Tom20, dann mit Tom22, zuletzt mit Tom40 bei der Translokation über die Außenmembran der Mitochondrien erfolgt (Komiya *et al.*, 1998, Rapaport *et al.*, 1998b). Fällt die erste Station dieser Reihe fort wie beim TOM-Core-

Komplex oder in Mutanten ohne Tom20, bindet das Vorstufenprotein offenbar direkt an Tom22.

Die Interaktion von Vorstufenproteinen mit Tom40 während der Translokation über die mitochondriale Außenmembran wurde bereits gezeigt (Rapaport *et al.*, 1998b). Sie spiegelt sich in der Bindung von pSu9-DHFR an den trypsinisierten isolierten TOM-Core-Komplex wieder.

Die Wechselwirkung des Vorstufenproteins mit Tom20, Tom22 und Tom40 (Söllner *et al.*, 1989, Söllner *et al.*, 1990, Kiebler *et al.*, 1993) wird durch die hohe Affinität, die pSu9-DHFR zum isolierten TOM-Holo-Komplex, zum isolierten TOM-Core-Komplex und zum trypsinisierten isolierten TOM-Core-Komplex hat, bestätigt.

Die präsequenzabhängige Bindung von Vorstufenproteinen wie Su9-DHFR an isolierten Tom40-Komplex konnte in vorliegender Arbeit nicht gezeigt werden. Es wurden allerdings Ergebnisse von Versuchen mit rekombinant exprimiertem, renaturiertem und in Liposomen rekonstituiertem Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae* veröffentlicht, nach denen radiochemische Mengen von Su9-DHFR an dieses Tom40 binden – und zwar sechs Mal besser als von DHFR (Hill *et al.*, 1998). Die Relevanz dieser Ergebnisse wird dadurch beeinträchtigt, daß nur mit radiochemischen Mengen und nicht mit chemischen Mengen an Vorstufenprotein gearbeitet wurde. Der Anteil an total eingesetztem Vorstufenprotein, der an Tom40 band, lag lediglich bei 6,6 % bei Su9-DHFR und 1,1 % bei DHFR. Möglicherweise waren die anderen Vorstufenproteine oder Tom40 nicht bindekompetent. Ähnliche Ergebnisse wurden vor kurzem von Gordon und Mitarbeitern erzielt (Gordon *et al.*, 2001). Die Fähigkeit von Tom40, Vorstufenproteine spezifisch zu binden, spricht dafür, daß zumindest Teile der als *Cis*- und *Trans*-Bindungsstellen bezeichneten Bindungsstellen auf Tom40 selbst lokalisiert sind (Rapaport *et al.*, 1997).

Mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden wurden keine quantitativen Aussagen zur Affinität der Bindung von Vorstufenproteinen an die TOM-Komplex-Formen gemacht. Durch Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie-Messungen (FCS), bei der die Diffusionskonstante einzelner fluoreszenzmarkierter Moleküle oder Komplexe bestimmt wird, konnten in unserem Arbeitskreis in Zusammenarbeit mit Markus Dembowski die

apparenten Dissoziationskonstanten von pSu9-DHFR an isolierten TOM-Holo-Komplex auf $1,4 \pm 0,3$ nM und an isolierten TOM-Core-Komplex auf $3,4 \pm 1,0$ nM bestimmt und damit deren Größenordnung in nanomolaren Bereich aufgezeigt werden (Stan *et al.*, 2000). Im Vergleich hierzu wurde für isoliertes humanes Tom20 in Gegenwart von amphipatische Helices induzierenden Mengen an Detergens die Dissoziationskonstante auf $0,6 \mu\text{M}$ bestimmt (Schleiff and Turnbull, 1998b). Diese im Laufe dieser Arbeit bekanntgewordenen Werte für bestimmte Tom-Komponenten stützen die sogn. „binding chain hypothesis“, daß das Vorstufenprotein von Bindungsstellen niedriger Affinität zu solchen hoher Affinität weitergeleitet wird (Pfanner and Geissler, 2001). In den durchgeführten Experimenten war eine Unterscheidung verschieden affiner Bindungsstellen für Vorstufenproteine am TOM-Core-Komplex bisher nicht möglich.

Die in dieser Arbeit bestimmte Stöchiometrie der Bindung des Modellvorstufenproteins Su9-DHFR an den TOM-Core-Komplex von acht Molekülen Vorstufenprotein zu einem Komplexmolekül deutet darauf hin, daß jede Tom40-Komponente ein Vorstufenprotein binden kann. Allerdings muß angemerkt werden, daß die Vorstufenproteinmoleküle sowohl an die cytosolische Seite als auch an die Intermembranraumseite des isolierten TOM-Core-Komplexes binden könnte. Das heißt, die Stöchiometrie kann nicht ohne Weiteres so interpretiert werden, daß jeweils ein Vorstufenproteinmolekül an ein Tom40-Molekül vom Cytosol aus binden kann. Weiterführende Experimente müssen zeigen, wie viele Vorstufenproteine von welcher Seite an welche Komponenten des TOM-Komplexes binden.

Die hohe Affinität von Präproteinen zu isoliertem TOM-Core-Komplex sollte es uns in weiterführenden Experimenten auch erlauben, Präproteine in der Translokationspore des TOM-Komplexes mittels elektronenmikroskopischer Methoden sichtbar zu machen. Darüber hinaus ermöglicht sie in kristallographischen Ansätzen Präprotein und TOM-Komplex zu kokristallisieren.

4.4 Die Struktur des TOM-Komplexes

4.4.1 Die Rolle der Rezeptoren Tom70 und Tom20 in der Struktur des TOM-Komplexes

Die Isolierung eines TOM-Komplexes ohne die Rezeptoren Tom70 und Tom20 als intakter ca. 400 kDa großer Komplex und die damit möglichen strukturellen und funktionellen Untersuchungen haben ergeben, daß die beiden Rezeptorproteine Tom70 und Tom20 nicht wesentlich zur hochmolekularen Struktur des TOM-Holo-Komplexes beitragen und man berechtigterweise von diesem TOM-Komplex ohne Tom20 und Tom70 als TOM-Core-Komplex sprechen kann.

Untersuchungen an Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*, bei denen die Rezeptorproteine Tom70/71 und Tom20 nur als lose mit dem TOM-Komplex assoziiert bestimmt wurden, führten zu der Hypothese, der TOM-Komplex sei eine dynamische Struktur, in der die Rezeptorproteine nur temporär mit dem TOM-Core-Komplex interagierten (Dekker *et al.*, 1996, Ryan and Pfanner, 1998, Meisinger *et al.*, 1999). Auch in *Neurospora crassa* Mitochondrien ließen sich TOM-Komplexe mit unterschiedlichem Tom70-Anteil ausmachen (Künkele, 1999). Wurde der TOM-Holo-Komplex jedoch aus *Neurospora crassa* Außenmembranvesikeln in Digiton isoliert, dann waren Tom70 und Tom20 so fest an diesen Komplex gebunden, daß keine nennenswerte Abreicherung von Tom70 im Verhältnis zu den anderen Tom-Komponenten Tom20, Tom22 und Tom40 während der Aufreinigung festgestellt werden konnte (ebd.). Das spricht gegen eine große Dynamik des TOM-Komplexes zumindest in *Neurospora crassa*.

Die letzte Bestätigung, daß die Rezeptoren Tom70 und Tom20 für die Bildung der Komplexstruktur nur eine untergeordnete strukturelle Rolle spielen, lieferten die EM-Bilder. Die 3D-Rekonstruktion des TOM-Core-Komplexes zeigte eindeutig, daß der TOM-Core-Komplex eine Zweiringstruktur mit zwei durchgehenden Poren bildet. Nur der unter dem Elektronenmikroskop im TOM-Holo-Komplex-Bild sichtbare dritte Ring könnte von den Rezeptoren Tom70 und Tom20 gebildet werden, die im TOM-Core-Komplex fehlen. Ob dies wirklich der Fall ist, kann nur auf der

Grundlage weiterer Untersuchungen – beispielsweise anhand von EM-Bildern von TOM-Holo-Komplex mit gebundenem Antikörper gegen Tom20 oder Tom70 – entschieden werden.

Sicher ist – wie elektrophysiologische Messungen am Core-Komplex bestätigen –, daß die Rezeptoren Tom70 und Tom20 nicht an der oligomeren Organisation des TOM-Proteintranslokationskanals beteiligt sind. Eine weitere Bestätigung dafür boten die EM-Bilder von isoliertem Tom40-Komplex, in denen ganz analoge Grundstrukturen wie beim TOM-Core-Komplex zu sehen waren – wenn auch bevorzugt nur mit einem Kanal.

4.4.2 Die Sekundärstruktur des Tom40

Um Aussagen über die interne Struktur des TOM-Komplexes treffen zu können, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe verschiedener Methoden die Sekundärstruktur des Tom40-Komplexes untersucht. Während mitochondriales Porin, das zum Vergleich unter den selben Bedingungen wie der Tom40-Komplex untersucht wurde, 46-48 % β -Faltblatt- und nur 15 % α -Helix-Strukturen aufwies, zeigte Tom40 einen signifikant geringeren Anteil an β -Faltblatt-Strukturen zwischen 22 % und 31 %.

CD- und FTIR-Spektren von mitochondrialem Porin führten zu einer weitgehend identischen Sekundärstrukturabschätzung, wie bereits von Shao *et al.*, 1996 für *Neurospora crassa* VDAC gezeigt.

Die Sekundärstrukturabschätzung für Tom40 ergab – selbst unter Berücksichtigung möglicher Ungenauigkeiten –, daß Tom40 aus *Neurospora crassa* anteilmäßig weniger Aminoacylreste in β -Faltblatt-Strukturen aufweist als mitochondriales Porin.

Für rekombinant exprimiertes Tom40 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein von dem in vorliegender Arbeit gemessenen CD-Spektrum für Tom40 aus *Neurospora crassa* sehr abweichendes CD-Spektrum veröffentlicht (Hill *et al.*, 1998). Für Hefe Tom40 wurde eine Sekundärstruktur mit mehr als 60 % β -Faltblatt- und weniger als 5 % α -Helix-Strukturen vorhergesagt. Wie der Unterschied zu *Neurospora crassa* Tom40 zu erklären ist, bleibt zu diskutieren. Da jedoch rekombinant exprimiertes *Saccharomyces cerevisiae*-

Tom40 aus bakteriellen Einschlußkörperchen renaturiert werden mußte, ist es denkbar, daß die Faltung von *Saccharomyces cerevisiae*-Tom40 nicht unbedingt der von Tom40 in der mitochondrialen Außenmembran entspricht. Hierfür würde auch sprechen, daß CD-Spektren von Hefe-Tom40 bei 217 nm noch einen Nulldurchgang sowie negative CD-Signale bei 230 nm zeigten. In der vorliegenden Arbeit waren viele unklassische Einzelpartikel von Tom40 im Transmissions-EM-Bild zu sehen, da Tom40 schon ohne Renaturierung zur Aggregation tendierten. Dafür würde auch der Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen *Neurospora crassa*-Tom40 und Hefe-Tom40 sprechen (siehe unten).

4.4.3 Die Rolle von Tom40 an der Struktur des TOM-Komplexes

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten untermauern die These, daß Tom40 allein in der Lage ist, den Proteintranslokationskanal, der vom TOM-Komplex in der Außenmembran der Mitochondrien konstituiert wird, zu bilden. Interessanterweise lieferte isoliertes und aufgereinigtes Tom40 aus *Neurospora crassa* in Übereinstimmung mit rekombinant exprimiertem und renaturiertem Tom40_{his6} (Hill *et al.*, 1998) in elektrophysiologischen Untersuchungen kationenselektive Kanäle, die mit Präpeptiden spezifisch blockiert werden konnten. Neueste Untersuchungen zeigten, daß rekombinantes Hefe-Tom40 ohne Beteiligung anderer Faktoren mit sich selbst assoziieren kann (Gordon *et al.*, 2001).

Die elektronenmikroskopischen Bilder von isoliertem Tom40-Komplex zeigten Strukturen, die denen von isoliertem TOM-Core-Komplex gleichen - nur daß in letzteren die Zweilochpartikel dominieren, während es in ersteren die Einlochpartikel tun. Das heißt, daß das Tom40 ohne die anderen Tom-Komponenten die Grundstruktur des TOM-Komplexes bilden kann. Daß Tom40-Moleküle bevorzugt Strukturen mit einer Pore bilden, mag auf einen stabilisierenden Einfluß der anderen Tom-Komponenten – Tom22 und Tom6 – für die Zweilochpartikel hinweisen, wie dies auch für die Struktur des Tom-Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* angenommen wird (Dekker *et al.*, 1998, van Wilpe *et al.*, 1999). Die EM-Bilder von trypsinisiertem TOM-

Core-Komplex machen deutlich, daß Tom40 zusammen mit den verbliebenen hydrophoben Resten von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 hinreicht, um die Tom-Core-Komplex-Struktur *stabil* zu bilden. Obwohl das Fehlen der Reste die Struktur destabilisieren mag, zeigt das EM-Bild von *Neurospora crassa*-Tom40 eindeutig, daß Tom22 oder auch nur der membranständige Teil von Tom22 in *Neurospora crassa* nicht notwendig ist, um höhere Formen der TOM-Komplex-Grundstruktur zu bilden, wie dies in Hefe vermutet wird (van Wilpe *et al.*, 1999).

4.4.4 Die Bildung der „Generellen Import-Pore“ (GIP)

Der Anteil der an β -Faltblatt-Strukturen beteiligten Aminoacylreste im Tom40 ist signifikant geringer als in mitochondrialem Porin (höchstens 31 % gegenüber 46-48 %). Von bakteriellen Porinen, wie OmpF oder PhoE, ist bekannt, daß einzelne Monomere β -Barrel-förmige Kanäle formen und mehrere Monomere einen mehrere Kanäle aufweisenden Oligomer bilden (Cowan *et al.*, 1992). OmpF besteht aus 340 Aminoacylresten, von denen 194 in 16 antiparallele β -Faltblätter eingebunden sind: Das sind 55,9 %. Mitochondriales Porin aus *Neurospora crassa* besteht aus 283 Aminoacylresten und bildet als Monomer einen Kanal mit einem Innendurchmesser von ca. 2,5 nm (Mannella, 1998). Da dieses mitochondriale Porin so klein ist, müssen mindestens 70 % aller Aminoacylreste in 16 β -Faltblatt-Strukturen angeordnet sein, um ein hinreichend großes β -Barrel bilden zu können (Murzin *et al.*, 1994).

Vom etwas größeren Tom40 aus *Neurospora crassa* sollten gemäß der IR-Spektren etwa 108 Aminoacylreste (31 % von 349) in die Bildung von β -Faltblatt-Strukturen involviert sein. Daraus ließen sich zehn membrandurchspannende β -Faltblätter bilden mit einer Länge von 10-11 Aminoacylresten. Das ist für membranspannende β -Faltblätter in β -Barrel-Strukturen von Porinen die absolute Untergrenze an Durchschnittslänge (Koeunik *et al.*, 2000).¹¹

¹¹ Die minimale Anzahl von Aminoacylresten, die nötig ist, um als β -Faltblatt die Membran zu durchspannen wird zwar mit 6 angegeben, die Durchschnittslänge der β -Faltblätter liegt aber bei 10,4-14,4 Aminoacylresten –

Theoretische Überlegungen zur β -Barrel-Struktur zeigen, daß ein β -Barrel aus zehn β -Faltblättern mit einer Scher-Nummer¹² von 12, welche wohl das Äußerste für eine membrandurchspannende β -Barrel-Struktur mit zehn Blättern wäre, einen Außendurchmesser von höchstens 1,9 nm bzw. einen Innendurchmesser von 1,4 nm aufweisen könnte. Das wäre für den Kanal des TOM-Komplexes zu klein. Der in den EM-Bildern und in elektrophysiologischen Messungen bestimmte Innendurchmesser des Kanals im TOM-Komplex beträgt nämlich mindestens 2,1 nm (TOM-Core-Komplex), wenn nicht gar 2,5 nm (Tom40-Komplex). Der Schluß kann nur sein, daß ein Tom40-Monomer nach den in Kap.3.4 dargelegten Daten nicht alleine einen β -Barrel-förmigen Kanal zu bilden vermag. Daher kann die Struktur des Tom40 nicht der der Porine analog sein, wie dies früher angenommen wurde (Court *et al.*, 1995, Mannella *et al.*, 1996).

Daß ein TOM-Kanal (GIP) nicht von einem Tom40-Monomer alleine gebildet werden kann, heißt nicht, daß dieser Kanal nicht eine β -Barrel-Struktur aufweisen könnte. Diese müßte dann aus mehreren Monomeren zusammengesetzt sein. Daß dies möglich ist, zeigen TolC und α -Hämolysin. Bei TolC handelt es sich um einen, den periplasmatischen Raum überspannenden Kanal in *E. coli*, dessen in die bakterielle Außenmembran integrierte β -Domäne eine 12-Blatt- β -Barrel-Struktur bildet, die aus jeweils 4 Faltblättern von jedem der drei Protomere zusammengesetzt ist (Koronakis *et al.*, 1997). Im α -Hämolysin aus Staphylokokken wird die membrandurchspannende β -Barrel-Struktur aus sieben Protomeren gebildet, die jeweils zwei β -Faltblätter zur Bildung des Kanals in der Lipidmembran beisteuern (Song *et al.*, 1996).

Die Frage, wieviele Tom40-Monomere einen Kanal bilden, kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Denkbar wäre die Bildung der GIP durch zwei Tom40-Monomere, wie dies für den TOM-Komplex von

wobei die Proteine mit β -Barrel-Strukturen aus geringer Anzahl von β -Faltblättern eine größere Durchschnittslänge dieser Blätter aufweist als die anderen (Koebnik *et al.*, 2000, Table 2).

¹² Die Scher-Nummer (im Englischen: shear number) gibt die Verschiebung der einzelnen Blätter in einer β -Barrel-Struktur an (Liu, 1998). Scher-Nummer und Anzahl der Faltblätter, die ein β -Barrel konstituieren, legen dessen Dimensionen eindeutig fest. Der Radius des idealen β -Barrels ist durch $R = \sqrt{[(Sa)^2 + (nb)^2]} / [2n \sin(\pi/n)]$ festgelegt. Dabei bedeuten: R = Radius des Barrels, S = Scher-Nummer, n = Anzahl der β -Faltblätter, a = Abstand von einem C $^\alpha$ -Atom zum nächsten C $^\alpha$ -Atom im Blatt, b = Abstand zwischen den Blättern. a ist empirisch auf 0,33nm, b auf 0,44 nm bestimmt (Murzin *et al.*, 1994).

Saccharomyces cerevisiae postuliert wurde (van Wilpe *et al.*, 1999). Auf Grundlage der in Kap. 3.4 dargestellten Ergebnisse zur Sekundärstruktur von Tom40 könnte ein Dimer von Tom40 16 β -Faltblätter mit einer Durchschnittslänge der Blätter von 14,5 Aminoacylresten bilden, die sich zu einer hinreichend großen Pore zur Translokation von mitochondrialen Vorstufenproteinen organisieren. Darumherum müssten sich die anderen, nicht in β -Faltblättern organisierten Teile des Tom40 sowie die anderen zentralen TOM-Komplex-Untereinheiten Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 anordnen. Ein von zwei Tom40-Untereinheiten gebildeter Kanal würde aber nicht zu der Stöchiometrie und den EM-Bildern des Komplexes passen: danach bilden sechs bis acht Tom40 zwei Kanäle.

Als ergänzende Untersuchungen wäre beispielsweise denkbar, EM-Bilder mit höherer Auflösung zu erhalten, z.B. indem man Bilder von zweidimensionalen Kristallen vom TOM-Core-Komplex aufnimmt. Eine Strukturanalyse mittels Röntgenstrahlbeugung an dreidimensionalen Kristallen des TOM-Komplexes könnte weitere sichere Daten zur Struktur des Komplexes liefern.

5 Zusammenfassung

Die Biogenese von Mitochondrien erfordert den Eintransport cytosolisch synthetisierter Vorstufenproteine über die mitochondriale Außenmembran. Der TOM-Komplex in der Außenmembran erkennt die in die Mitochondrien zu importierenden Vorstufenproteine, bindet sie, ermöglicht den Transfer von zumindest Teilen davon über die mitochondriale Außenmembran und die Integration von Membranproteinen in die Außenmembran. Auf der Grundlage bestehender Untersuchungen des TOM-Holo-Komplexes wurden in dieser Arbeit verschiedene Subkomplexe des TOM-Komplexes aus *Neurospora crassa* isoliert, biochemisch und biophysikalisch charakterisiert. Zudem wurde eine neue Komponente des TOM-Komplexes identifiziert: Tom5, eine kleine Komponente von etwa 5 kDa mit Sequenzhomologie zu Tom5 von *Saccharomyces cerevisiae*.

Der in dieser Arbeit isolierte TOM-Core-Komplex besteht aus den Proteinuntereinheiten Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5; gegenüber dem TOM-Holo-Komplex fehlen ihm die Rezeptorkomponenten Tom70 und Tom20. Der TOM-Core-Komplex weist eine Molekülmasse von ca. 400 kDa und eine Stöchiometrie der Komponenten Tom40 : Tom22 : Tom7 : Tom6 von 8 : 4 : 2 : 1-2 auf. Er kann *in vitro* präsequenzabhängig bis zu 8 Vorstufenproteine pro Komplex binden. Elektronenmikroskopische Bilder des TOM-Core-Komplexes zeigen eine symmetrische Doppelringstruktur mit zwei durchgehenden Poren von etwa 2,1 nm Durchmesser. Der TOM-Core-Komplex bildet in Übereinstimmung damit Kanäle mit zwei Leitfähigkeitsniveaus, die zwei Poren entsprechen. Die Bevorzugung von Kationen und die Eigenschaft, durch mitochondriale, positiv geladene Präpeptide selektiv und spezifisch inhibiert zu werden, belegen die Rolle des TOM-Core-Komplexes bei der Proteintranslokation.

TOM-Core-Komplex, dessen hydrophile Domänen von Tom22 und den kleinen Toms durch limitierte Proteolyse weitgehend abgedaut wurden, zeigte in den durchgeführten Untersuchungen nahezu identische Binde-, Kanal- und Struktureigenschaften wie der unbehandelte Core-Komplex. Die Grundstruktur der Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran

kann somit hinreichend durch Tom40 und die membrandurchspannenden Domänen von Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 stabil gebildet werden.

Weiterführende Experimente mit isoliertem Tom40 bestätigten dies. So bildet isoliertes Tom40 oligomere Strukturen mit einer mittleren Molekülmasse von ca. 350 kDa. Tom40 zeigte sich in Transmissions-EM-Bildern überwiegend als Einlochpartikel. In Übereinstimmung hiermit weisen die vom Tom40-Komplex gebildeten Kanäle eine Leitfähigkeit von nur der Hälfte der Leitfähigkeit des TOM-Core-Komplexes mit zwei Poren auf.

Ein kleiner Teil des isolierten Tom40 bildet Zweilochpartikel. *Tom40 ist also in der Lage, die Grundstruktur des TOM-Komplexes zu bilden, wie sie für den TOM-Core-Komplex gefunden wurde.*

Infrarot- und Circular dichroismus-Spektren von isoliertem Tom40 führen zu dem Schluß, daß ein einzelnes Tom40-Protomer keinen Kanal mit β -Barrel-Struktur bilden kann, sondern daß dazu mehrere Tom40 zusammenwirken müssen.

6 Anhang: Die bekannten Tom-Komponenten

Die Proteinsequenz folgender Tom-Komponenten ist bekannt (In Klammern ist jeweils die sog. „Accession-Nummer“ der jeweiligen Datenbanken angegeben, soweit eine bekannt ist):

- Tom71
aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P38825),
- Tom70
aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P07213), *Neurospora crassa* (Swiss-Nr.: P23231), *Podospira anserina* (Swiss-Nr.: O13499) und *Schizosaccharomyces pombe* (Swiss-Nr.: O14217),
- Tom40
aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P23644), *Neurospora crassa* (Swiss-Nr.: P24391), *Caenorhabditis elegans* (WormPep-Nr.: C18E9.6), *Drosophila melanogaster* (Swiss-Nr.: Q9U4L6), *Mus musculus* (Swiss-Nr.: Q9Z2N1), *Rattus norvegicus* (Suzuki *et al.*, 2000) und Mensch (Swiss-Nr.: O96008); aus *Schizosaccharomyces pombe* sind zwei Fragmente von Tom40 bekannt (Swiss-Nr.: O13655 und O13656),
- Tom37
aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P50110),
- Tom22
aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P49334), *Schizosaccharomyces pombe* (Macasev *et al.*, 2000), *Neurospora crassa* (Swiss-Nr.: Q07335), *Botrytis cinerea* (Macasev *et al.*, 2000), *Caenorhabditis elegans* (WormPep-Nr.: CE14794 12), *Rattus norvegicus* (Macasev *et al.*, 2000), *Mus musculus* (Macasev *et al.*, 2000), Mensch (Swiss-Nr.: BAB03306), *Arabidopsis thaliana* (zwei Gene, siehe Macasev *et al.*, 2000), *Gossypium hirsutum* (Macasev *et al.*, 2000), *Oryza sativa* (Macasev *et al.*, 2000) und *Pinus taeda* (Macasev *et al.*, 2000),
- Tom20
aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P35180), *Neurospora crassa* (Swiss-Nr.: P35848), *Caenorhabditis elegans* (Swiss-Nr.: Q19766), *Rattus norvegicus* (Swiss-Nr.: Q62760), Mensch (Swiss-Nr.: Q15388),

Solanum tuberosum (Swiss-Nr.: P35180) und *Arabidopsis thaliana* (drei Gene; EMBL-Nr.n: AJ296023-5),

- Tom7

aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P53507), *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL-Nr.: O42999), *Neurospora crassa* (Genbank-Nr.: AF321883), Mensch (EMBL-Nr.: O95939), *Solanum tuberosum* (Swiss-Nr.: O82067), *Brassica napus* (Translation aus Genbank Nr.L35838, siehe Jansch *et al.*, 1998), *Oryza sativa* (Translation aus Genbank Nr.D22755, siehe Jansch *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Jansch *et al.*, 1998) und *Caenorhabditis elegans* (WormPep-Nr.: CE00448),

- Tom6

aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P33448) und *Neurospora crassa* (Genbank-Nr.: AF321882),

- Tom5

aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swiss-Nr.: P80967), *Neurospora crassa* (*Neurospora crassa* evening cDNA-Library Klon-Nr.: e4g06ne.r1) und *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea* strain T4 cDNA library under conditions of nitrogen deprivation Klon-Nr.AL110849).

7 Zitierte Literatur

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. und Kohda, D. (2000): Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-60.
- Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1995): The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol*, **15**, 6196-205.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. und Brunner, M. (2000): Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol*, **10**, 25-31.
- Bauer, M.F., Rothbauer, U., Muhlenbein, N., Smith, R.J., Gerbitz, K., Neupert, W., Brunner, M. und Hofmann, S. (1999): The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett*, **464**, 41-7.
- Benz, R. (1994): Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta*, **1197**, 167-96.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Borel, A.C. und Simon, S.M. (1996): Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell*, **85**, 379-89.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brix, J., Dietmeier, K. und Pfanner, N. (1997): Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem*, **272**, 20730-5.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider Mergener, J. und Pfanner, N. (1999): Distribution of binding sequences for the mitochondrial import

- receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem*, **274**, 16522-30.
- Byler, D.M. und Susi, H. (1986): Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, **25**, 469-87.
- Court, D.A., Lill, R. und Neupert, W. (1995): The protein import apparatus of the mitochondrial outer membrane. *Can J Bot*, **73**, S193-S197.
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. und Rosenbusch, J.P. (1992): Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature*, **358**, 727-33.
- Daum, G., Bohni, P.C. und Schatz, G. (1982): Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **257**, 13028-33.
- Davis, A.J., Sepuri, N.B., Holder, J., Johnson, A.E. und Jensen, R.E. (2000): Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *J Cell Biol*, **150**, 1271-82.
- Davis, R.H. und De Serres, F.J. (1970): Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.*, **17**, 79-143.
- Dekker, P.J., Muller, H., Rassow, J. und Pfanner, N. (1996): Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol Chem*, **377**, 535-8.
- Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1998): Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, **18**, 6515-24.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner Washburne, M., Craig, E.A. und Schekman, R. (1988): A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, **332**, 800-5.
- Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M. und Pfanner, N. (1997): Tom5 functionally

- links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore [see comments]. *Nature*, **388**, 195-200.
- Endres, M., Neupert, W. und Brunner, M. (1999): Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J*, **18**, 3214-21.
- Freitag, H., Benz, R. und Neupert, W. (1983): Isolation and properties of the porin of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol*, **97**, 286-94.
- Freitag, H., Genchi, G., Benz, R., Palmieri, F. und Neupert, W. (1982): Isolation of mitochondrial porin from *Neurospora crassa*. *FEBS Lett*, **145**, 72-6.
- Funfschilling, U. und Rospert, S. (1999): Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell*, **10**, 3289-99.
- George, R., Beddoe, T., Landl, K. und Lithgow, T. (1998): The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2296-301.
- Goping, I.S., Millar, D.G. und Shore, G.C. (1995): Identification of the human mitochondrial protein import receptor, huMas20p. Complementation of delta mas20 in yeast. *FEBS Lett*, **373**, 45-50.
- Gordon, D.M., Wang, J., Amutha, B. und Pain, D. (2001): Self-association and precursor protein binding of *Saccharomyces cerevisiae* Tom40p, the core component of the protein translocation channel of the mitochondrial outer membrane. *Biochem J*, **356**, 207-215.
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R.E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S.D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G. und Horst, M. (1995): Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J Cell Biol*, **129**, 25-34.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G. und Lithgow, T. (1995): Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature*, **376**, 705-9.
- Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E. und Johnson, A.E. (1997): The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during

- cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*, **89**, 535-44.
- Hammen, P.K. und Weiner, H. (2000): Structure of the cytosolic domain of TOM5, a mitochondrial import protein. *FEBS Lett*, **468**, 101-4.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. und Akey, C.W. (1996): Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 721-32.
- Harkness, T.A., Metzenberg, R.L., Schneider, H., Lill, R., Neupert, W. und Nargang, F.E. (1994a): Inactivation of the *Neurospora crassa* gene encoding the mitochondrial protein import receptor MOM19 by the technique of "sheltered RIP". *Genetics*, **136**, 107-18.
- Harkness, T.A., Nargang, F.E., van der Klei, I., Neupert, W. und Lill, R. (1994b): A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol*, **124**, 637-48.
- Haucke, V., Horst, M., Schatz, G. und Lithgow, T. (1996): The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. *EMBO J*, **15**, 1231-7.
- Hawltischek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U. und Neupert, W. (1988): Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, **53**, 795-806.
- Hegde, R.S. und Lingappa, V.R. (1997): Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell*, **91**, 575-82.
- Hegerl, R. (1996): The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy. *J Struct Biol*, **116**, 30-34.
- Heinrich, S.U., Mothes, W., Brunner, J. und Rapoport, T.A. (2000): The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell*, **102**, 233-44.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1997): Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the

- mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*, **418**, 367-70.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1998): Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2250-5.
- Henry, J.P., Juin, P., Vallette, F. und Thieffry, M. (1996): Characterization and function of the mitochondrial outer membrane peptide-sensitive channel. *J Bioenerg Biomembr*, **28**, 101-8.
- Herrmann, J.M. und Neupert, W. (2000): What fuels polypeptide translocation? An energetical view on mitochondrial protein sorting. *Biochim Biophys Acta*, **1459**, 331-338.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. und Pfanner, N. (1998): Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature*, **395**, 516-21.
- Hinnah, S.C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T. und Soll, J. (1997): Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J*, **16**, 7351-60.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. und Pfanner, N. (1996): Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J*, **15**, 2125-37.
- Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. und Braun, H.P. (1998): Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *J Biol Chem*, **273**, 17251-7.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983a): Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-637.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983b): How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Lett*, **155**, 179-82.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W. und Douglas, M.G. (1993): Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *EMBO J*, **12**, 3023-34.

- Kassenbrock, C.K., Gao, G.J., Groom, K.R., Sulo, P., Douglas, M.G. und Martin, N.C. (1995): RPM2, independently of its mitochondrial RNase P function, suppresses an ISP42 mutant defective in mitochondrial import and is essential for normal growth. *Mol Cell Biol*, **15**, 4763-70.
- Kauppinen, J.K., Moffat, D.J., Mantsch, H.H. und Cameron, D.G. (1981): Fourier-self-deconvolution: A method for resolving intrinsically overlapped bands. *Appl Spectroscopy*, **35**, 271-76.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B. und Jensen, R.E. (2000): Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell*, **11**, 103-16.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I.J., Pfanner, N. und Neupert, W. (1993): The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell*, **74**, 483-92.
- Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990): Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature*, **348**, 610-6.
- Klaus, C., Guiard, B., Neupert, W. und Brunner, M. (1996): Determinants in the presequence of cytochrome b2 for import into mitochondria and for proteolytic processing. *Eur J Biochem*, **236**, 856-61.
- Kleffel, B., Garavito, R.M., Baumeister, W. und Rosenbusch, J.P. (1985): Secondary structure of a channel-forming protein: porin from E. coli outer membranes. *EMBO J*, **4**, 1589-92.
- Koebnik, R., Locher, K.P. und Van Gelder, P. (2000): Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*, **37**, 239-253.
- Koehler, C.M. (2000): Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett*, **476**, 27-31.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. und Schatz, G. (1999): Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2141-6.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. und Or, E. (2000): Tim18p, a new

- subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 1187-93.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. und Mihara, K. (1998): Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J*, **17**, 3886-98.
- Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E. und Stauffer, K. (1997): Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol*, **23**, 617-26.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E. und Pfanner, N. (2001): Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J Cell Biol*, **152**, 289-300.
- Künkele, K.P. (1999): *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des isolierten Proteintranslokationsapparates der mitochondrialen Außenmembran*, München.
- Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. und Neupert, W. (1998a): The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-19.
- Künkele, K.P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F.E., Henry, J.P., Neupert, W., Lill, R. und Thieffry, M. (1998b): The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem*, **273**, 31032-9.
- Kyhse Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J-Biochem-Biophys-Methods*, **10**, 203-9 issn: 0165-022x.

- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S. und Hieter, P. (1995): Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci*, **20**, 257-9.
- Lee, C.M., Sedman, J., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1999): The DNA helicase, Hm1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem*, **274**, 20937-42.
- Lithgow, T. (2000): Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett*, **476**, 22-26.
- Lithgow, T., Junne, T., Suda, K., Gratzer, S. und Schatz, G. (1994a): The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11973-7.
- Lithgow, T., Junne, T., Wachter, C. und Schatz, G. (1994b): Yeast mitochondria lacking the two import receptors Mas20p and Mas70p can efficiently and specifically import precursor proteins. *J Biol Chem*, **269**, 15325-30.
- Liu, W.M. (1998): Shear numbers of protein beta-barrels: definition refinements and statistics. *J Mol Biol*, **275**, 541-5.
- Lustig, A., Engel, A., Tsiotis, G., Landau, E.M. und Baschong, W. (2000): Molecular weight determination of membrane proteins by sedimentation equilibrium at the sucrose or nycodenz-adjusted density of the hydrated detergent micelle. *Biochim Biophys Acta*, **1464**, 199-206.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J. und Lithgow, T. (2000): How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from Arabidopsis differ from their fungal counterparts. *Plant Physiol*, **123**, 811-6.
- Mannella, C.A. (1998): Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *J Struct Biol*, **121**, 207-18.
- Mannella, C.A., Neuwald, A.F. und Lawrence, C.E. (1996): Detection of likely transmembrane beta strand regions in sequences of mitochondrial pore proteins using the Gibbs sampler. *J Bioenerg Biomembr*, **28**, 163-9.

- Manting, E.H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A. und Driessen, A.J. (2000): SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J*, **19**, 852-61.
- Mayer, A., Lill, R. und Neupert, W. (1993): Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol*, **121**, 1233-43.
- Mayer, A., Neupert, W. und Lill, R. (1995): Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell*, **80**, 127-37.
- Meisinger, C., Brix, J., Model, K., Pfanner, N. und Ryan, M.T. (1999): The preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: receptors and a general import pore. *Cell Mol Life Sci*, **56**, 817-24.
- Metzenberg, R.L. und Grotelueschen, J. (1992): Disruption of essential genes in *Neurospora* by RIP. *Fungal Genet Newsl*, **39**, 37-49.
- Mihara, K. und Omura, T. (1996): Cytosolic factors in mitochondrial protein import. *Experientia*, **52**, 1063-8.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. und Brunner, M. (1999): The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *EMBO J*, **18**, 3667-75.
- Murakami, H., Pain, D. und Blobel, G. (1988): 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol*, **107**, 2051-7.
- Murzin, A.G., Lesk, A.M. und Chothia, C. (1994): Principles determining the structure of beta-sheet barrels in proteins. I. A theoretical analysis. *J Mol Biol*, **236**, 1369-81.
- Nargang, F.E., Künkele, K.P., Mayer, A., Ritzel, R.G., Neupert, W. und Lill, R. (1995): 'Sheltered disruption' of *Neurospora crassa* MOM22, an essential component of the mitochondrial protein import complex. *EMBO J*, **14**, 1099-108.
- Neupert, W. (1997): Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, **66**, 863-917.
- Neupert, W. und Lill, R. (1994): Protein synthesis. Cradle at the ribosome [news]. *Nature*, **370**, 421-2.

- Nuttall, S.D., Hanson, B.J., Mori, M. und Hoogenraad, N.J. (1997): hTom34: a novel translocase for the import of proteins into human mitochondria. *DNA Cell Biol*, **16**, 1067-74.
- Pelleschi, M., Henry, J.P. und Thieffry, M. (1997): Inactivation of the peptide-sensitive channel from the yeast mitochondrial outer membrane: properties, sensitivity to trypsin and modulation by a basic peptide. *J Membr Biol*, **156**, 37-44.
- Pfaller, R., Steger, H.F., Rassow, J., Pfanner, N. und Neupert, W. (1988): Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site. *J Cell Biol*, **107**, 2483-90.
- Pfanner, N. und Geissler, A. (2001): Versability of the Mitochondrial Import Machinery. *Nature Reviews Mol Cell Biol*, **2**, 339-349.
- Ralston, G. (1993): *Introduction to Analytical Ultracentrifugation*. Beckman, Fullerton.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. und Schatz, G. (1993): Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J*, **12**, 4115-23.
- Rapaport, D., Künkele, K.P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F.E., Neupert, W. und Lill, R. (1998a): Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 5256-62.
- Rapaport, D., Mayer, A., Neupert, W. und Lill, R. (1998b): cis and trans sites of the TOM complex of mitochondria in unfolding and initial translocation of preproteins. *J Biol Chem*, **273**, 8806-13.
- Rapaport, D., Neupert, W. und Lill, R. (1997): Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence. *J Biol Chem*, **272**, 18725-31.
- Richards, F.M. (1977): Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **6**, 151-76.
- Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P. (1990): *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Rosenbusch, J.P., Lustig, A., Grabo, M., Zulauf, M. und Regenass, M. (2001): Approaches to determining membrane protein structures to high resolution: do selections of subpopulations occur? *Micron*, **32**, 75-90.
- Ryan, M.T., Muller, H. und Pfanner, N. (1999): Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **274**, 20619-27.
- Ryan, M.T. und Pfanner, N. (1998): The preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *Biol Chem*, **379**, 289-94.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning*. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J. und Dalbey, R.E. (2000): YidC mediates membrane protein insertion in bacteria [see comments]. *Nature*, **406**, 637-41.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-31.
- Schleiff, E. und Turnbull, J.L. (1998a): Characterization of the N-terminal targeting signal binding domain of the mitochondrial outer membrane receptor, Tom20. *Biochemistry*, **37**, 13052-8.
- Schleiff, E. und Turnbull, J.L. (1998b): Functional and structural properties of the mitochondrial outer membrane receptor Tom20. *Biochemistry*, **37**, 13043-51.
- Schwartz, M.P. und Matouschek, A. (1999): The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13086-90.
- Sebald, W., Neupert, W. und Weiss, H. (1979): Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria. *Methods Enzymol*, **55**, 144-8.
- Shao, L., Kinnally, K.W. und Mannella, C.A. (1996): Circular dichroism studies of the mitochondrial channel, VDAC, from *Neurospora crassa*. *Biophys J*, **71**, 778-86.

- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. und Brunner, M. (1998): Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**, 912-5.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N. und Neupert, W. (1989): MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell*, **59**, 1061-70.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990): A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell*, **62**, 107-15.
- Söllner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W. und Pfanner, N. (1992): Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature*, **355**, 84-7.
- Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. und Gouaux, J.E. (1996): Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore [see comments]. *Science*, **274**, 1859-66.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Künkele, K.-P., Nussberger, S., Neupert, W. und Rapaport, D. (2000): Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J*, **19**, 4895-4902.
- Suzuki, H., Okazawa, Y., Komiya, T., Saeki, K., Mekada, E., Kitada, S., Ito, A. und Mihara, K. (2000): Characterization of rat TOM40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **275**, 37930-6.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*, **76**, 4350-4 issn: 0027-8424.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1999): Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, **401**, 485-9.

- Verner, K. (1993): Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. *Trends Biochem Sci*, **18**, 366-71.
- Vernet, T., Dignard, D. und Thomas, D.Y. (1987): A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene*, **52**, 225-33.
- Vestweber, D., Brunner, J., Baker, A. und Schatz, G. (1989): A 42K outer-membrane protein is a component of the yeast mitochondrial protein import site. *Nature*, **341**, 205-9.
- Vogel, H.J. (1964): Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *The Americ. Nat.*, **98**.
- Voisine, C., Craig, E.A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N. und Voos, W. (1999): The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell*, **97**, 565-74.
- von Heijne, G. (1986): Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, **5**, 1335-42.
- Wang, Y. und Weiner, H. (1993): The presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase requires the presence of an alpha-helix at its N-terminal region which is stabilized by the helix at its C termini. *J Biol Chem*, **268**, 4759-65.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. und Braun, H.-P. (2001): Purification and Characterisation of the Outer Mitochondrial Membrane from Arabidopsis. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol*, **125**, 943-954.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A. und Wiedmann, M. (1994): A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, **370**, 434-40.

8 Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen

Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. und Nussberger, S. (2001): Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **153**, 1151-60.

Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. und Nussberger, S. (1999): The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-68.

Diekert, K., de Kroon, A.I., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B. und Lill, R. (2001): Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *Embo J*, **20**, 5626-35.

Rapaport, D., Künkele, K.P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F.E., Neupert, W. und Lill, R. (1998): Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 5256-62.

Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Künkele, K.-P., Nussberger, S., Neupert, W. und Rapaport, D. (2000): Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J*, **19**, 4895-4902.
(T. Stan and U. Ahting contributed equally to this work)

Danksagung

Danken möchte ich vielen Menschen im Zusammenhang mit meiner Doktorarbeit.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, sein Interesse an der Arbeit und seine Ratschläge.

Bei Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger bedanke ich mich dafür, daß er diese Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilians-Universität vertritt.

Bei den unmittelbaren Betreuern meiner Arbeit, Dr. Roland Lill und besonders Dr. Stephan Nußberger, bedanke ich mich für die umfassende Betreuung.

Des Dankes voll bin ich für die vielen Kollaboratoren in anderen Laboren als dem Prof. Neuperts.

Damit meine ich zunächst Prof. Dr. Wolfgang Baumeister, in dessen Labor in Zusammenarbeit mit Dr. Stephan Nußberger EM-Aufnahmen durchgeführt werden konnten, und seinen Mitarbeiter Dr. Reiner Hegerl, der die EM-Bild-Auswertungssoftware zu Verfügung stellte und immer hilfsbereit war.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Luis Moroder wurden die CD-Messungen durchgeführt. Frau E. Weyer war dabei sehr hilfsbereit.

In der Arbeitsgruppe von Dr. Harald Engelhardt wurden die FTIR-Spektren gemessen.

Dr. Ariel Lustig am Biozentrum der Universität Basel führte die analytischen Ultrazentrifugationen aus.

Im Labor von Dr. Lutz Eichacker am Botanischen Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität wurden die im Gel verdauten Peptidfragmente über HPLC aufgetrennt und sequenziert.

Prof. Dr. Michel Thieffry am Laboratoire de Neurobiologie, Cellulaire et Moléculaire du CNRS führte die Einzelkanalmessungen durch.

Sehr dankbar bin ich den helfenden Mitarbeitern im Labor Ute Staudinger, Marlies Braun, Frau Köber, Frau Lapchansky und Frau Reisenauer. Bei meinen hilfsbereiten Kollegen bedanke ich mich, namentlich Clemens Thun, Simone Schmitt, Klaus Peter Künkele, Markus Dembowski, Tina Stan, Michael Käser, Klaus Leonhard, Doron Rapaport, Petra Heckmeyer, Christian Kozany, Kai Hell.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern.

Lebenslauf

	Uwe Hergen Ahting	
	8.11.1965	geboren in Oldenburg i.O. als Sohn von Hergen Ahting und Gertrud Ahting, geb. Fontaine.
Schulbesuch:	9.1972 bis 6.1985	zuletzt: Gymnasium Eversten in Oldenburg
	12.6.1985	Abitur als Abschluß des Gymnasiums
Wehrdienst:	7.1985 bis 9.1986	Flugabwehrraketenbataillon 26, Wangerland
Studium:	10.1986 bis 9.1987	Studium Generale am Leibniz-Kolleg in Tübingen
	10.1986 bis 1.1994	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls- Universität in Tübingen
	4.1991 bis 3.1992	Studienaufenthalt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München
	14.1.1994	Diplom als Abschluß des Biochemiestudiums
	10.1987 bis 2.1996	Studium der Kunstgeschichte und der Philosophie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
	14.2.1996	Magister Artium als Abschluß des Magisterstudiums
	5.1996	Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Physiologische Chemie der LMU in München im Labor von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert